UNIVERSITÉ DE PARIS
Année 1964 - 1965

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série U — N° 419

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

par

Simon-Claude STUDIEVIC

PHARMACIEN

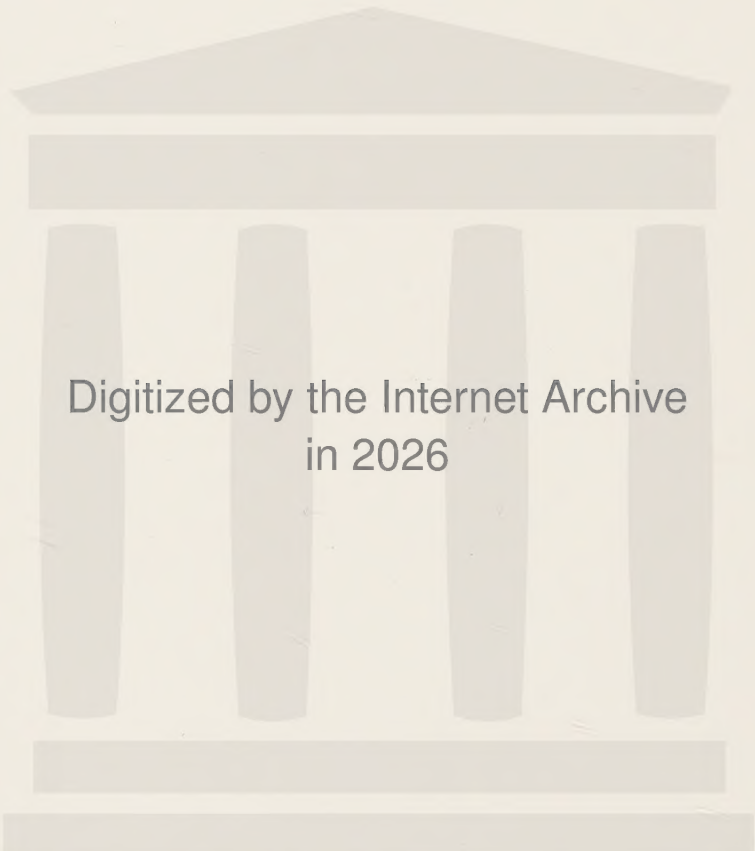
Diplômé d'Etudes Supérieures d'Analyse Physico-Chimique
Appliquée au contrôle des Médicaments

Lauréat de la Faculté

soutenue le : 25 JUIN 1965

AUTOMATISATION DES RÉACTIONS DE FIXATION DU COMPLÉMENT

JURY : Mademoiselle LAMBIN — Président
Messieurs : GERMAN
BORY
VARGUES — Examinateurs


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534911_0007

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

PERSONNEL

DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. VALETTE . . . . . Doyen, O +, O X, C ///
M. MM. JANOT . . . . . Assesseur, O +, C ///
M. P. MALANGEAU . . . . . Assesseur, O ///
M. L. RODINEAU . . . . . Secrétaire Général, +, O ///
Mme S. FERRARI . . . . . Attachée Principale, ///
Mme M.L. ESPINASSE . . . . . Attachée, O ///
M. L. JEANDEL . . . . . Attaché, O ///
Mme C. PEILLON . . . . . Attachée
M. A. BRENN . . . . . Attaché, +
Mlle G. BIDEAU . . . . . Secrétaire
Mme S. CERTAIN . . . . . Secrétaire, O ///
Mme M. COUSIN . . . . . Secrétaire, O ///
Mme T. ROUVEURE . . . . . Secrétaire
Mme L. WARNESSON . . . . . Secrétaire, ///

DOYEN HONORAIRE

M. R. FABRE . . . . . Membre de l'Institut, C + C ///

PROFESSEURS HONORAIRES

M M. DELEPINNE . . . . . Membre de l'Institut, C + C ///
M. L. LAUNOY . . . . . O +, O ///
M. P. FLEURY . . . . . O +, C ///
M. M. PICON . . . . . O +, O ///
M. C. BEDEL . . . . . +, O ///
M. R. FABRE . . . . . Membre de l'Institut, C + C ///

.../...

PROFESSEURS

M.	MM. JANOT, O +, C ///	Pharmacie Galénique (T)
M.	G. VALETTE, O +, O X, C ///	Pharmacodynamie (T)
M.	R. PARIS, +, O ///	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
M.	M. GUILLOT, +, O ///	Physique (T)
M.	J.A. GAUTIER, +, O /// . . .	Chimie organique (T)
Mlle	S. LAMBIN, +, O ///	Microbiologie (T)
M.	Y. RAOUL, +, O ///	Physiologie (T)
M.	J. COURTOIS, +, O ///	Chimie biologique (T)
M.	L. DOMANGE, +, C ///	Chimie minérale (T)
M.	P. CRETE, +, O ///	Botanique (T)
M.	R. TRUHAUT, O +, O /// . . .	Toxicologie et Hygiène industrielle (T
M.	A. MORETTE, +, O ///	Hydrologie (T)
M.	R. CAVIER, O ///	Parasitologie (T)
M.	A. OUEVAUVILLER, +, O /// .	Hygiène et Education Sanitaire (T)
M.	R. MOREAU, +, O ///	Pharmacie chimique (T)
M.	A. GERMAN, O ///	Virologie et sérologie (T)
M.	M. PIETTE, +, O ///	Biologie sanguine (T)
M.	P. MALANGEAU, O ///	Chimie analytique (T)
M.	M. GIRARD, O ///	Biochimie appliquée (T)
M.	G. DILLEMAIN, ...	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M.	G. DEYSSON, O ///	Cytologie végétale (T)
M.	J. FLAHAUT, ///	Minéralogie (T)
M.	C. BOUDENE, ...	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M.	J. RENAULT, ///, ...	Chimie organique (T)
M.	A. LE HIR, ...	Pharmacie galénique
M.	P. LARUELLE, ...	Physique
M.	P. ROSSIGNOL, ...	Pharmacodynamie
M.	A. MANGEOT, O ///, ...	Pharmacie galénique industrielle
M.	P. DELAVEAU, ...	Matière médicale
M.	Y. COHEN, ...	Sciences naturelles
M.	H. RENAULT, ...	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M.	R. BOURDON, ...	Chimie analytique
M.	G. LE MOAN, ...	Sciences appliquées
M.	C. PAOLETTI, ...	Sciences appliquées
M.	P. REYNAUD, ...	Sciences physico-chimiques
M.	J. POISSON, ...	Sciences naturelles
M.	A. DESVIGNES, ///, . .	Cryptogamie et technique bactériologique
M.	F. PERCHERON, ...	Sciences appliquées
M.	J. SAVEL, ...	Biologie animale
M.	J. BORY, ///, ...	Sciences naturelles
M.	M. MIOCQUE, ...	Chimie organique
M.	J.L. GUIGNARD, ...	Botanique générale
M.	J.C. GOUNELLE, ...	Sciences naturelles
M.	P. BINET, ...	Biologie animale et Zoologie
M.	C. COMBET-FARNOUX,	Chimie organique
Mme	M. PLAT, ...	Sciences appliquées
M.	E. DELACOUX, ...	Sciences physico-chimiques
M.	J. DIDRY (F. F.)	Mathématiques appliquées aux Sciences Expérimentales

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Mme	J. BLANC (F. F.)	Chimie analyses (1ère année N.)
M.	A. CARLIER (F. F.) . .	C.E.S. Pharmacie galénique Industrielle
M.	J. CHARLES (F. F.) . .	Mathématiques
M.	C. DAGRON (F. F.) . . .	Chimie préparations (1ère année N.)
Mlle	M.T. DECAUDIN (F. F.)	Biologie animale (3ème année)
M.	C. DREUX (F. F.) . . .	C.E.S. Electrochimie appliquée à l'analyse
Mlle	G. DUMANT (F. F.). . .	Chimie préparations (1ère année N.)
M.	P. GEORGES (F. F.) . .	C.E.S. Parasitologie
M.	P. GESTEAU, +, O /// .	C.E.S. Biochimie
Mlle	M.J. GOURSAT (F. F.) .	Chaire de Botanique
M.	H. GUERIN, +, O ///,. .	Biologie végétale (3ème année)

M.	M. GUERNET, ...	Chimie (2ème et 3ème année)
M.	M. HAMON (F. F.) . . .	Chimie analyses (1ère année N.)
M.	J. HARISPE, O ///, . . .	Chimie préparations (1ère année)
M.	G. HAZEBROUCQ (F. F.)	Physique
M.	J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme	J. HUBERT	C.E.S. Bactériologie
Mme	M.J. HURON (F. F.) . .	Mathématiques
Mlle	Y. JUND.	C.E.S. Microbiologie
M.	M. LEBOEUF (F. F.) . .	C.E.S. Pharmacotechnie
Mme	N. LEGER (F. F.)	Zoologie
M.	R. LELUC	Microbiologie (4ème année)
M.	A. LEMONNIER	Chimie analyses (2ème et 3ème années)
Mme	S. LEMONTEY	Chimie (4ème année)
Mlle	M. LONGEVIALLE (F.F.)	Chaire de botanique
Mlle	S. LONGUEVALLE, O ///	Chimie examens
M.	J. MANDEREAU (F. F.).	C.E.S. Pharmacotechnie
M.	H. MARTIN-FRERE (F.F.)	Chimie préparations (1ère année N.)
Mlle	H. MORIN, O ///	C.E.S. Pharmacodynamie
M.	H. MOSKOWITZ (F. F.) .	Chimie analyses (1ère année N.)
Mme	M.J. NOTTEGHEN (F.F.)	Zoologie
M.	NGUYEN PHU LICH . . .	C.E.S. Toxicologie
M.	M. PARIS (F. F.)	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Biol.)
M.	R. PERLES.	C.E.S. Biochimie
M.	J. PESTIS (F. F.)	Biologie animale (2ème année)
M.	P. POULLAIN	C.E.S. Hématologie
M.	J. RIVET (F. F.)	Chaire de Physique
Mme	M. ROBERT	C.E.S. Sérologie
Mlle	A. ROLLEN, +, O /// . .	Biologie végétale (2ème année)
Mlle	L. SEGUIN, O /// (F. F.)	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Physico-chimie)
Mme	M. SEILLER (F. F.). . .	Pharmacie galénique industrielle
M.	J. YONGER (F. F.) . . .	Chimie analytique (1ère année)

BIBLIOTHEQUE

Mlle Y. RUYSSEN, +, O ///	Conservateur
Mlle S. LAVAUD, +, O ///	Conservateur
Mme G. KREHMER, O ///	Conservateur
Mme A. DESGRIPPES, O ///	Bibliothécaire

LEGENDES

+	Légion d'honneur	O	Officier
X	Ordre National du Mérite	C	Commandeur

/// Palmes Académiques

A LA MEMOIRE DE MA MERE
Auschwitz 1945

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MARIE-PIERRE

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOS JUGES

Mademoiselle le Professeur LAMBIN

Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui nous a fait le grand honneur
de nous accueillir et d'accepter
la présidence du jury de cette thèse.

Monsieur le Professeur GERMAN

Professeur de Virologie et de Sérologie
à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui nous a fait l'honneur
de faire partie du jury

Monsieur le Professeur BORY

Professeur de Sciences Naturelles
à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui a bien voulu accepter de juger ce
travail, et dont l'ouvrage nous a été
précieux.

Monsieur le Professeur VARGUES

Professeur à titre personnel
à la Faculté de Médecine et de
Pharmacie de Tours

Qui nous a incité à présenter ce
travail, après l'avoir animé de
son esprit scientifique et nous
avoir encouragé de sa chaleureuse
sympathie.

A NOS MAITRES

A NOS MAITRES

Monsieur le Professeur DOMANGE

Professeur de Chimie Minérale
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Directeur du Laboratoire National
de Contrôle des Médicaments

Dont la sollicitude et la bienveillance à notre égard ne se sont jamais démenties. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre plus vive gratitude.

Monsieur le Professeur J. RENAULT

Professeur à titre personnel
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef du Centre Hospitalier
de Saint-Denis.

En témoignage de reconnaissance pour le vivant enseignement que nous avons reçu de lui.

Monsieur SAINZ

Pharmacien
Maître de Stage à Paris

Qui nous a donné les bases et nous a communiqué sa foi en notre profession.

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

A CEUX QUI ONT PERMIS CE TRAVAIL.

Monsieur le Professeur DAUSSET

Professeur Agrégé à la
Faculté de Médecine de Paris

Qu'il soit ici remercié de la confiance qu'il nous a manifestée et de l'aide que ses collaborateurs de l'Hôpital St-Louis nous ont apportée.

Monsieur Guy CHARLAP
ses collaborateurs
et nos amis de la Compagnie TECHNICON

En témoignage de notre sincère gratitude.

AUTOMATISATION
DES
REACTIONS DE FIXATION
DU COMPLEMENT

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	. . . . .	page 3
CHAPITRE I	- Description de l'Ensemble Analytique automatique utilisé	" 7
CHAPITRE II	- Principes de Technique	" 11
CHAPITRE III	- Automatisation du dosage du Complément Conséquences théoriques	" 22
CHAPITRE IV	- Dosage automatique des Antigènes . . .	" 34
CHAPITRE V	- Automatisation des Titrages des Anticorps	" 40
CHAPITRE VI	- Réalisation automatique des Réactions de fixation du Complément - Application à des séries de déterminations	" 52
CHAPITRE VII	- Application de l'Automatisation des réactions de fixation du Complément . .	" 63
CHAPITRE VIII	- Automatisation de la mise en évidence des effets Anti-complémentaires	" 72
CONCLUSIONS	. . . . .	" 76
ANNEXE I	- Remarques concernant la réalisation des RFC en séries continues	" 79
ANNEXE II	- Réactifs	" 81
BIBLIOGRAPHIE	. . . . .	" 83

ABREVIATIONS UTILISEES

E . . . . . Erythrocytes

A . . . . . Sérum hémolytique (ambocepteur)

EA . . . . . Erythrocytes sensibilisés

Ag . . . . . Antigène

Ac . . . . . Anticorps

C' . . . . . Complément

Unité C'H 50 . . . Quantité de complément donnant 50 % d'hémolyse

Unité C'H 100 . . Quantité de complément donnant 100 % d'hémolyse

RFC . . . . . Réaction de fixation du complément

PAC . . . . . Effet (pouvoir) anti-complémentaire

D.O. . . . . Densité optique

INTRODUCTION

En 1901, Bordet et Gengou imaginent une nouvelle méthode générale pour la détection et le dosage des anticorps anti-bactériens, c'est la réaction dite "déviation du complément" : en mélangeant une suspension bactérienne donnée avec l'antisérum correspondant, et en ajoutant du complément sous forme de sérum frais, le complément se trouve "fixé" ou "dévié" par le système Anticorps-Antigène. Si, dans un second temps, on ajoute un complexe hémolytique, qui sert de révélateur du complément, on n'observe aucune hémolyse. En utilisant cette technique, Bordet et Gengou mettent en évidence les "sensibilisatrices" (= anticorps fixant le complément) vis-à-vis de Pasteurella pestis, Bacillus anthracis, Salmonella typhi, Proteus vulgaris.

En 1902, Gengou montre que la réaction de fixation du complément est valable quand on utilise des antigènes protéiniques solubles (lactosérum de vache, blanc d'oeuf, fibrinogène de cheval, sérum de chien) et les immuno-sérums correspondants.

En 1906, Wassermann, Neisser et Bruck utilisent la technique de Bordet pour rechercher les anticorps anti-tréponémiques chez les malades syphilitiques. La méthode donne de bons résultats. C'est en fait, la première application pratique de la réaction de fixation du complément.

En 1906 également, Muller et Oppenheim appliquent la réaction de Bordet à la gonococcie chronique (gono-réaction).

En 1907, Widal et Lesourd montrent que, dans certains cas, la réaction de fixation du complément est applicable à la tuberculose.

La réaction de Bordet-Gengou paraissait donc une réaction d'un emploi très général.

Cet élan rapide vers la généralisation de la réaction de fixation du complément se trouva arrêté brusquement en 1907 quand Levaditi et Marie remplacèrent avantageusement dans la réaction de BW l'antigène tréponémique spécifique de Wassermann (extrait de foie d'hérédo-syphilitique) par un extrait alcoolique de coeur de boeuf. La réaction de Wassermann ne fut donc plus considérée comme une réaction immunologique (combinaison d'un antigène avec l'anticorps correspondant), mais comme un phénomène physico-chimique peu spécifique résultant de "l'action des suspensions colloïdales de lipides sur les albumines du sérum et du liquide céphalo-rachidien" (Demanche).

Pendant plus de 30 ans, la réaction de fixation du complément fut considérée théoriquement comme une réaction immunologique spécifique, mais pratiquement comme une réaction de "déséquilibre colloïdal non spécifique". Cette conception donnait de bons résultats en sérologie syphilitique. Les recherches furent orientées vers l'utilisation pratique du BW. En 1909, Hecht propose la technique "au sérum frais". Puis Jacobsthal propose la réaction de fixation du complément avec

fixation à froid (à 0° pendant 1 heure). En 1911, Calmette et Massol donnent une technique à 4 tubes utilisant 2, 4, 6 et 8 unités de complément. En 1933, Debains propose la réaction de fixation du complément avec "titrage indirect du complément", d'exécution plus rapide.

A partir de 1935, Kolmer étudie la technique de réaction de fixation du complément dite "de fixation prolongée à froid". Toutes ces réactions concernent presque exclusivement la sérologie syphilitique. Dans le même temps, les recherches portent sur les modes de préparation et de purification de l'antigène extrait du coeur de boeuf. Le travail le plus important est celui de Pangborn qui aboutit à l'isolement d'un phosphatide, la cardiolipine, auquel est liée l'activité sérologique. De plus l'addition de cholestérol et de lécithine renforcent cette activité sérologique (31).

PROBLEMES ACTUELS DE SEROLOGIE SYPHILIGRAPHIQUE.

En ce qui concerne particulièrement le diagnostic sérologique de la syphilis, les recherches récentes portent sur l'emploi des nouveaux antigènes tréponémiques, sur l'utilisation des méthodes sérologiques basées sur l'immunofluorescence, enfin sur la comparaison des différentes réactions avec le test de Nelson. En France, ces problèmes ont fait l'objet d'un certain nombre de recherches et de mises au point.

Pillot et ses collaborateurs (35, 36, 37, 53) ont comparé systématiquement les résultats donnés avec l'antigène tréponémique de Reiter et ceux obtenus dans les techniques classiques. D'autre part, ces auteurs ont essayé de préciser la structure de l'antigène protéique de groupe mis en jeu. Pautrizel et ses collaborateurs ont abordé également ce problème (32, 33). Waisman et Hamelin (12, 45, 46) ont donné les résultats de l'application de ces divers textes modernes et montré que chaque test sérologique semble mettre en évidence un type d'anticorps particulier.

En 1960, Bory (6) précise la technique qui doit être mise en oeuvre quand on utilise l'antigène tréponémique. Avec German en 1961, il étudie les résultats obtenus dans l'emploi systématique de l'Antigène de Reiter (13).

Des travaux sur l'immunofluorescence appliquée à la syphilis ont été exposés par Borel (5) en 1959. A l'hôpital Saint-Louis, Collombani et Ripault (9) ont particulièrement appliqué ce test et l'ont comparé avec la réaction de Nelson et les résultats de la sérologie classique.

Le test d'immobilisation des tréponèmes fut également largement étudié. Citons en particulier les travaux de Fribourg-Blanc (11), ceux d'Alline (1).

Mikol (24, 25, 26) à différentes reprises, a effectué des mises au point concernant l'utilisation de ces diverses méthodes.

La réaction de fixation du complément devait retrouver sa spécificité avec le développement de la virologie. En effet, dès qu'on sut préparer des suspensions virales assez riches en particules virulentes, on songea à utiliser ces suspensions en guise d'antigènes. Or la seule réaction qui convenait avec de tels antigènes était la réaction de fixation du complément de Bordet.

A partir de 1935, la culture des virus ou des microbes voisins sur embryon de poulet fournit des suspensions antigéniques utilisables en sérologie. La réaction de fixation du complément est trouvée positive dans le lymphogranulome vénérien de Cox. De même, les sérums de malades atteints de grippe, d'oreillons, de poliomyélite etc ... donnent des réactions de fixation du complément positives avec les suspensions virales spécifiques. A mesure que ces recherches pratiques progressent, les sérologistes reconnaissent la nature immunologique de la réaction de Bordet. En syphilis, on revient complètement à la spécificité en utilisant, conjointement avec la cardiolipine, un antigène protéinique tréponémique extrait de la souche Reiter. D'autre part, les progrès réalisés dans la connaissance des protéines sériques font abandonner les notions de "déséquilibre colloïdal" et permettent de localiser les anticorps spécifiques dans la fraction gamma-globulinique. La réagine, qui correspond à l'anticorps réagissant avec l'haptène cardiolipidique doit maintenant être considéré comme globuline douée de spécificité immunologique.

Ainsi, on revient au concept immunologique de Bordet. Cette longue histoire de la réaction de fixation du complément a été fructueuse pour de multiples raisons : la réaction de fixation du complément est, de toutes les réactions sérologiques, celle qui se prête le plus aisément aux modifications techniques. Plusieurs centaines de protocoles opératoires ont été proposées pour la seule réaction de fixation du complément dans la syphilis. D'autre part, puisque il s'agit de réactions immunologiques spécifiques et, puisque le nombre des antigènes est très grand, il en résulte que le nombre de réactions de fixation du complément possible est incalculable.

Cependant, malgré les très nombreuses recherches consacrées à la réaction de fixation du complément, cette réaction est demeurée jusqu'à présent très empirique, échappant à toute possibilité d'analyse quantitative théorique. Les seuls travaux théoriques sur la réaction de fixation du complément sont les suivants :

- en 1940, Heidelberger calcule la quantité d'azote complémentaire qui se fixe sur un système anticorps-antigène (environ 0,05 mg de C'N par ml) (15).

- en 1955, Osler étudie la cinétique de la réaction de fixation du complément sans pouvoir définir la forme mathématique du phénomène (14, 30).

- en 1962, Norden étudie le même problème (22, 29).

- à partir de 1962, Vargues et collaborateurs (47, 48, 49, 50, 51, 52) ont apporté des résultats quantitatifs démontrant que la réaction de fixation du complément doit être assimilée à une réaction cinétique de premier ordre.

En conclusion, il apparaît que la réaction de fixation du complément est une réaction sérologique importante en raison de son utilisation très générale. Mais jusqu'à présent, elle est restée dans le domaine de l'empirisme se prêtant facilement à l'application pratique mais en se dérobant à une analyse théorique précise.

Le but de notre travail a été d'introduire l'automatisation dans la réaction de fixation du complément dans les perspectives de recherches suivantes :

1° Peut-on, grace à l'automatisation, dégager une expression plus complète que celle déjà proposée dans la thèse d'Ayeva ? (3)

2° Peut-on utiliser l'automatisation pour obtenir des courbes de titrage plus précises que celles obtenues avec les méthodes manuelles d'échantillonnage ?

3° Enfin, peut-on automatiser la technique de fixation du complément ?

CHAPITRE I

DESCRIPTION DE L'ENSEMBLE ANALYTIQUE AUTOMATIQUE UTILISE

Pour mettre en oeuvre la mise en contact des différents spécimens, introduire les différents réactifs et échantillons, assurer des temps de réaction réguliers puis la lecture et l'enregistrement des résultats, nous nous sommes adressés à un ensemble automatique d'analyse *, qui n'avait été appliqué jusqu'à ce jour qu'à des réactions de chimie classique (42).

Cet instrument (44), ou plus exactement, cette juxtaposition d'éléments instrumentaux, permet d'assembler un certain nombre de gestes classiques de l'analyse, avec la prise d'essai, la mesure des quantités appropriées d'échantillons et de réactifs, la mise en contact pendant des temps exactement choisis, l'appréciation colorimétrique ou turbidimétrique du milieu soumis et enfin, la visualisation graphique de l'intensité de la réaction développée.

Nous allons décrire les particularités de ce système analytique, son fonctionnement et les raisons qui ont commandé le choix d'un tel type d'appareillage.

Le principe essentiel réside en l'utilisation continue d'un fluide porteur, ou si l'on préfère le cheminement continu d'une veine de liquide vecteur. Cette colonne porteuse est constituée par les divers réactifs nécessaires à l'analyse et elle existe parce qu'un dispositif de pompage va puiser continuellement les dits réactifs à partir des récipients qui les contiennent. A cet effet, une pompe de type péristaltique, va presser, au moyen de galets solidaires d'une chaîne de galle, des tubes plastiques, tendus et maintenus en extension. La pression constante des galets va entraîner une aspiration continue des fluides par les tubes plastiques.

Ces fluides peuvent être mélangés entre eux, grâce à l'utilisation d'accessoires en verre, qui vont faciliter les mises en contact des différentes phases.

En utilisant des tubes plastiques de sections différentes, la colonne de liquide pompée sera différente, et par là même, le débit ou le nombre de millilitres délivrés par minute sera différent. Si bien que, en jouant d'un assortiment de divers tubes, on peut proportionner entre eux les divers réactifs que l'on doit introduire dans le système analytique et qui vont constituer notre colonne porteuse. La pompe, péristaltique de principe, est donc proportionnante par fonction. Cette colonne vectrice, constituée par tous les réactifs qui doivent entrer en action, ne va pas engendrer une réaction chimique, car manque encore l'admission d'un échantillon contenant la substance à doser.

* AutoAnalyseur Technicon Chauncey New York, U.S.A.

A un phénomène continu, nous allons superposer un phénomène discontinu. En effet, nous allons injecter dans la veine liquide les prélèvements soumis à l'analyse, et ce, les uns après les autres, en ayant soin de laisser s'écouler librement une colonne de liquide porteur entre deux échantillons.

D'où proviennent ces divers échantillons ? Ils ont été disposés dans de petites cupules à la périphérie d'une couronne métallique qui est destinée à supporter ces cupules. Cette couronne est solidaire d'un axe et d'un moteur, et sera entraînée en une lente rotation. Ce mouvement de rotation s'effectue solidairement avec la présentation d'un bec de pipettage face à l'un des godets. Lorsque ce bec est abaissé, il permet la plongée d'un cathéter dans le godet situé immédiatement au-dessous. Puis ce bec se relève, et la couronne tourne lentement de manière à présenter un autre godet sous le dispositif. Celui-ci s'abaisse alors permettant l'aspiration d'un autre volume d'un autre spécimen.

La répétition de ce mouvement est règlable de 20 à 70 fois par heure et représente donc le nombre d'analyses que l'on veut, ou que l'on peut effectuer en 60 minutes.

En fait, ce pompage en continu entraîne des problèmes. Il faut vaincre les forces de frottement dues aux phénomènes de Bernouilli qui, par le ralentissement des flux à l'interface liquide/parois des tubes, entraîneraient une accumulation de forces, et l'obligation d'utiliser un système de pompage surdimensionné.

Ces mêmes phénomènes s'accompagneraient de "traînées" le long des parois, avec adsorption de substances.

Par ailleurs, chacune des colonnes de liquides chargées d'échantillons verraient la création de traînées en avant et en arrière, dues à des phénomènes de diffusion des substances présentes, par agitation brownienne.

C'est pourquoi, l'appareil est conçu de telle sorte que le liquide porteur est subdivisé en un nombre régulier et constant de segments et ce, par l'introduction de bulles de gaz, le plus souvent de l'air. La colonne continue se trouve finalement n'être que la juxtaposition infinie de micro-colonnes, de micro-volumes de réaction, séparés par autant de bulles. Ces bulles vont permettre d'éviter l'addition de toutes les forces de frottement, de nettoyer physiquement les parois des tubes et d'empêcher les phénomènes de diffusion par blocage des traînées de substances et limitation dans l'espace des mouvements browniens.

A ce stade des opérations, nous disposons des réactifs et des échantillons. Nous allons pouvoir les mélanger intimement au moyen de petits enroulements verticaux où vont cheminer les flux, le passage dans chacune des spires de l'enroulement étant analogue au retournement d'un tube à essai. Puis, il va être possible de faire séjourner à une

température adéquate, pendant un temps choisi, les volumes de liquide et ce, en obtenant une circulation dans un long enroulement d'un serpentin de verre. Une aliquote de liquide pénètrant en A à l'instant t sortira en B à l'instant t'.

Si ce serpentin est situé dans un récipient isotherme, on peut ajouter et maintenir une température convenablement choisie. En sortie, le flux peut recevoir éventuellement de nouveaux réactifs, peut-être refroidi et même partiellement rejetté.

S'il s'est développé une réaction colorée, il va être important de la mesurer. On va faire passer les flux, après avoir laissé s'échapper librement les bulles de gaz, au travers de la cuvette de mesure d'un colorimètre. Une lampe d'excitation émet deux faisceaux dont l'un est dirigé sur une cellule photoélectrique référence à travers un système collimateur et un filtre interférentiel, tandis que l'autre, concentré par un système à miroir sur une cuve tubulaire à flux continu après avoir traversé un filtre interférentiel identique au premier, vient frapper une deuxième cellule photoélectrique, dite de mesure.

Il a été établi par construction que la quantité de lumière tombant sur la cellule de référence est plus importante que celle que reçoit la cellule de mesure de manière à pouvoir réduire la lumière côté référence au moyen d'un diaphragme. Lorsque seuls les réactifs traversent la cuve à flux continu, on amène grâce à ce diaphragme, la tension de référence à égalité avec la tension de mesure. Lorsque une réaction se produit, l'absorption décroit la tension de la cellule de mesure. Un servo-moteur déplace le curseur du potentiomètre de mesure placé aux bornes de la tension de référence et s'arrête lorsqu'un certain pourcentage de la tension de référence est égal à la tension de mesure. Ce qui correspond exactement au pourcentage de transmission, résultat de la réaction.

Le déplacement du curseur sur le potentiomètre entraîne le déplacement correspondant d'une plume et d'un stylet sur l'échelle en D.O. ou en transmission et sur le papier de l'enregistreur.

CHAPITRE II

PRINCIPES DE TECHNIQUE

I - POSSIBILITE D'APPLICATION A LA SEROLOGIE BASEE SUR L'HEMOLYSE.

Certains auteurs ont adapté cet appareillage à flux continu aux méthodes sérologiques mettant en oeuvre des réactions d'agglutination (23).

Dans nos premiers travaux, nous pensions adapter une méthode d'agglutination des hématies de mouton non hémolysées et séparation de ces agglutinats par la méthode de décantation (1, 43).

Cependant, il s'est révélé beaucoup plus simple d'utiliser l'appareillage en opacimétrie. En effet, dans le proche infra-rouge, les hématies non lysées absorbent les rayons lumineux. Au contraire, dès que les érythrocytes sont lysés, l'absorption diminue considérablement sans pour cela s'annuler complètement.

A titre d'exemple, si une suspension de 40.000 hématies par mm^3, lue au photomètre à 670 mmu, donne une absorption de 0,40 densité optique, dès que se produira l'hémolyse complète de ces cellules, l'absorption ne sera plus que de 0,03 densité optique.

Nous avons pu vérifier la bonne proportionnalité du phénomène en réalisant une expérience simple réunissant deux facteurs, hématies lysées et non lysées.

L'expérience a été réalisée en utilisant des mélanges convenables en proportions variées d'hématies lysées et non lysées; l'enregistrement de la densité optique a été effectuée au photomètre à 670 mmu.

Hématies lysées	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0
Hématies non lysées	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Tampon de M et L	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Appréciation visuelle	+++	++	++	+	0	0	0	0	0
Densité optique	0,02	0,05	0,08	0,11	0,14	0,17	0,20	0,23	0,27

De cette expérience on conclut à la validité de la méthode instrumentale pour apprécier les fractions d'hémolyse qui passent inaperçues à la lecture visuelle de la réaction.

Dans ces conditions, nous disposons d'un équipement pouvant apprécier quantitativement et d'une manière simple un gradient d'hémolyse immunologique.

II - APPLICATION A LA FIXATION DU COMPLEMENT.

Si nous pouvons lire, détecter et apprécier l'hémolyse immunologique, il suffit d'amener de manière convenable, au contact d'hématies sensibilisées, les diverses fractions intervenant dans la réaction. Dans le système analytique précédemment décrit, il est possible de développer une réaction en prolongeant le temps de contact des différents réactifs. C'est pourquoi nous avons pensé que le premier stade de fixation pouvait se réaliser dans l'appareillage. Nous avons adopté, pour des raisons matérielles, des méthodes qui proposaient des temps de contact de 30 minutes seulement, mais à 37°. Ce délai nous était imposé par suite de la difficulté, dans le système présent, de réaliser des serpentins de verre autorisant un plus long parcours.

Il a été par la suite prouvé que, cette notion de 30 mn à 37° était parfaitement justifiée, par une étude de l'influence de la température sur la fixation du complément (52).

Les sérums sont incubés avec le complément et l'antigène spécifique pendant 30 minutes de circulation dans une bobine de délai (double serpentin de canne de verre de 12 mètres de long sur 2 mm de diamètre interne). Puis le flux sortant reçoit les hématies sensibilisées et un court délai de 10 mn (12 m de canne de verre de diamètre interne de 1,5 mm) à 37°, va permettre au complément libre de se combiner et de réaliser l'hémolyse.

Si par contre, le complément a été fixé par le système Ag-Ac spécifique, cette hémolyse n'aura pas lieu. Ce qui sera détecté par le système de lecture opacimétrique et inscrit sur le papier de l'enregistreur couplé.

Si le complément est présent en quantité convenable, au cas où la fixation ne serait que partielle par suite d'une faible richesse en anticorps, l'hémolyse, ou plutôt l'inhibition de l'hémolyse ne sera que partielle, et proportionnelle à la quantité d'anticorps présente.

De ce qui précède découlent deux possibilités fondamentales :

1° Possibilité de réaliser un système analytique permettant la fixation du complément, la réalisation de l'hémolyse immunologique à l'aide du complément libre et ce, de manière entièrement automatique.

2° Possibilité de détection d'enregistrement et de lecture de quantités partielles d'hémolyse immunologique.

DOSAGES QUANTITATIFS AUTOMATIQUES DES REACTIFS

- METHODES DE DOSAGE DES REACTIFS - INTERET DES METHODES A VARIATION CONTINUE -

Lors de nos premiers essais (New-York Memorial Hospital, laboratoire du Dr Woods), nous avions cherché et obtenu des conditions convenables de concentration de réactifs en calquant purement et simplement une méthode officielle. Nous étions donc tenus de préparer des dilutions croissantes de réactifs (hémolysine ou complément) et de les introduire les unes après les autres dans le circuit analytique. Nous cherchions ensuite, sur l'enregistrement par exemple, la dilution de complément ou d'hémolysine qui cessait de donner l'hémolyse totale.

Cette méthode n'était guère satisfaisante parce que :

a) insuffisamment précise et ce point était délicat, notamment pour les titrages de complément,

b) ne libérant pas le technicien de séries de dilution en tubes,

c) peu homogène et peu compatible avec une vue suffisamment exhaustive de l'automatisation.

Cependant en 1963, Vargues et Ayeva (49) ont prouvé la validité des méthodes cinétiques avec utilisation de l'AutoAnalyseur, à propos de dosage du complément.

A l'aide d'un montage très simple, décrit par les auteurs, il est très possible de mettre en évidence la fixation du complément sur un système spécifique et ce, d'une manière continue qui s'exprime graphiquement par une courbe exponentielle, dont la pente exprime la vitesse de fixation du complément.

Il est donc apparu que l'obtention d'un tel type de courbe, dont l'interprétation mathématique est aisée, permettait d'accéder à un système homogène et continu de titration automatique.

Cependant, si l'on veut titrer l'activité d'un complément par rapport à un système hématies-hémolysine, on est obligé de partir d'une quantité arbitraire et fixe de complément. Nous obtiendrons une hémolyse, si celle-ci est suffisante, et aucun des paramètres ne variant, le phénomène sera continu et nous enregistrerons en continu l'hémolyse.

Dans ces conditions, nous avons pensé utiliser un système continu de variations de concentration. Nous avions deux possibilités :

La première consistait à obtenir un gradient linéaire de variation de concentration du réactif à doser. Ce gradient est obtenu à l'aide d'un appareil à chambres communicantes d'où l'on soutire par une extrémité les liquides des deux chambres. Si l'on soutire x ml/mn en A,

le liquide de B passera en A à raison de x ml/mn et viendra diluer ce liquide en proportion constante.

En réalité, un tel système permettrait une dilution quasi linéaire, et Peterson et Sober (34) y ont vu un intérêt important, mais dans notre cas, le fait de ne pas opérer à volume constant aurait considérablement compliqué les calculs.

C'est pourquoi nous avons repris le procédé de dilution continue proposé par Sandor et Vargues (41), en le transformant à volume constant de manière à pouvoir exprimer, par rapport au temps, le gradient de concentration.

Les courbes permettent de définir le pourcentage d'hémolyse 50 %, la titration d'un réactif, quelqu'il soit, se traduira par le pourcentage d'hémolyse 50 %, méthode précise recommandée par de nombreux auteurs : Von Krogh (54), Morse (28), Wadsworth (55), Roulier (39), Bory (6).

La titration alors obtenue par voie automatique supprime les fastidieuses préparations de dilution en tubes.

II - PRINCIPE GENERAL DU SYSTEME DE DILUTION EXPONENTIELLE CONTINUE

La technique sérologique ordinaire utilise un principe simple de dosage : on maintient constants tous les paramètres de la réaction à l'exception d'un seul d'entre eux dont on fait varier les quantités d'un tube à l'autre.

La précision du dosage dépend en partie du mode de dilution et du nombre de tubes utilisés, c'est-à-dire, que si les valeurs obtenues pour chacun des tubes sont reportées par exemple sur une courbe, chaque tube correspond à un point de cette courbe.

L'AutoAnalyseur permet d'effectuer automatiquement les dilutions et de multiplier à l'infini le nombre des points expérimentaux.

Pour cela nous allons placer dans un récipient la substance dont on veut doser l'activité (complément, antigène, sérum ...). La concentration initiale de cette substance se trouve être égale à C_o, sous un volume V. Prélevons à l'aide de la pompe proportionnante une quantité de liquide de x ml/mn. Mais, dans le même temps, nous allons affuser dans le même récipient et toujours à l'aide de la pompe, une quantité égale à quantité soustraite, c'est-à-dire x ml/mn. Le volume V va rester fixe et seule la concentration C va varier et ce, selon la formule

$$C = C_o \cdot e^{-kt}.$$

En effet, - au temps t la concentration est C

- au temps $t + \Delta t$ la concentration sera $C = \Delta C$

Pendant le temps Δt, on a prélevé $x \cdot \Delta t$ ml soit :
- $(x \cdot \Delta t \cdot C)$ ml, quantité qui a été enlevée du volume constant V.

La diminution de concentration est donc :

$$C = - \frac{x \cdot \Delta t \cdot C}{V} \quad \text{ou} \quad \frac{\Delta C}{\Delta t} = - \frac{x}{V} \cdot C$$

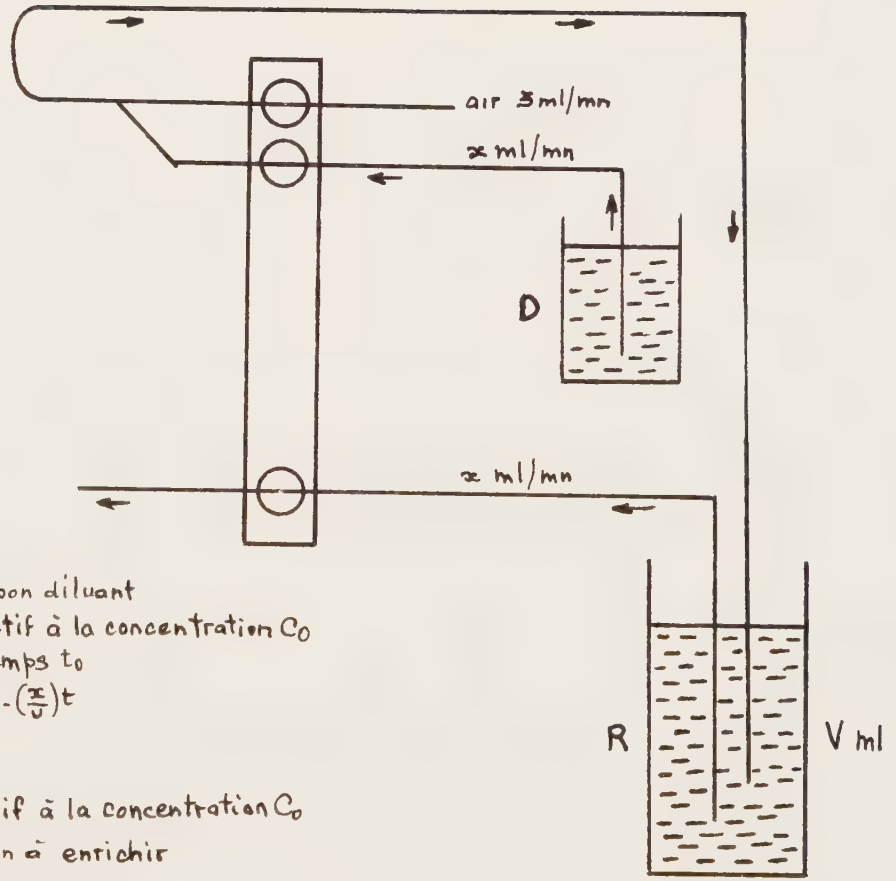
et en posant $\frac{x}{V} = k$

et en passant aux différentielles $\frac{dc}{dt} = - k \cdot C$

Séparons les variables $\frac{dC}{C} = - kdt$

et en intégrant $L_n C = - k \cdot t + Cte$

pour calculer la constante, on fait $t = O$



1er CAS - D - tampon diluant
R - Réactif à la concentration C_0 au temps t_0

$$C = C_0 . e^{-\left(\frac{x}{v}\right)t}$$

2e CAS - D - Réactif à la concentration C_0
V - tampon à enrichir

$$C = C_0 \left[1 - e^{-\left(\frac{x}{v}\right)t}\right]$$

Fig. 1 - SYSTEME DE DILUTION EXPONENTIELLE CONTINUE

or dans ce cas $C = C_o$ et $Cte = L_n\ C_o$

donc $L_n\ C - L_n\ C_o = - kt$

ou $L_n \frac{C}{C_o} = - kt$ (1) $\qquad \frac{C}{C_o} = e^{- kt}$

et $C = C_o \cdot e^{- kt}$ soit $\frac{C}{C_o} = e^{- kt}$

En reprenant l'équation (1) et en passant aux logarithmes décimaux on a

$$\log_{10} \frac{C}{C_o} = - 0,43 \cdot kt$$

On peut donc calculer $\frac{C}{C_o}$ en donnant à t les valeurs de 1, 2, 3 ...N minutes et donc de connaître la concentration de la substance à doser quand on connait le temps écoulé depuis le début de la dilution.

Ce procédé peut être utilisé de façon inverse. Le volume V correspond à du tampon physiologique et la concentration initiale en substance à doser est nulle. On prélève x ml par minute de ce liquide tampon, mais par le procédé décrit ci-dessus, on affuse x ml de la substance à la concentration C_o .

Cette fois-ci, le contenu du récipient va devenir de plus en plus riche, en substance à doser, suivant la formule :

$$C = C_o\ (1 - e^{-kt})$$

Pendant l'intervalle de temps Δ t on ajoute $x \cdot \Delta$ t ml de la solution de concentration C_o soit $(x \cdot \Delta\ t \cdot C_o)$ ml de la substance.

A ce moment, si on appelle C la concentration de la substance dans le récipient R, on soutire de R, pendant le temps Δ t $(x \cdot \Delta\ t)$ ml soit une quantité égale à $(x \cdot \Delta\ t \cdot C)$ ml de substance.

L'accroissement en substance, dans le récipient R, pendant l'intervalle de temps Δ t est donc :

$$(x \cdot \Delta\ t \cdot C_o) - (x \cdot \Delta\ t \cdot C) = (x \cdot \Delta\ t)\ (C_o - C)$$

et la variation de concentration Δ c dans le volume V est

$$\Delta\ c = \left(\frac{x \cdot \Delta\ t}{V}\right)\ (C_o - C)$$

soit, en passant aux différentielles $dc = \frac{x \cdot dt}{V} \cdot C_o - C$

soit $\frac{dc}{dt} = \frac{x}{V} \cdot C_o - C = k \cdot C_o - C$

ou $\frac{dC}{C_o - C} = k \cdot dt$ en intégrant $- \log (C_o - C) = kt + \text{const.}$

quand $t = O$ $C = O$ d'où constante $= - \log C_o$

d'où $- \text{Log } C_o + \text{Log } (C_o - C) = - kt$

$$\text{Log } \frac{C_o - C}{C_o} = - kt \quad \text{et} \quad \frac{C_o - C}{C_o} = e^{- kt}$$

Enfin $C_o - C = C_o \cdot e^{- kt}$

$C - C_o = - C_o \cdot e^{- kt}$

$C = C_o (1 - e^{- kt})$

On pourra, également dans ce cas, calculer $\frac{C}{C_o}$ selon les diverses valeurs que prendra t.

Dans ces deux cas la dilution est exponentielle et continue. Si on pose fixe la quantité prélevée appelée x, on peut donner à k toutes les valeurs voulues en faisant varier V et on réalise alors des dilutions d'autant plus rapides que V est petit. Le système de dilution est combiné au système automatique d'analyse. On obtient dans ces conditions, un grand nombre de points expérimentaux, puisque pratiquement, l'enregistreur va fournir une courbe continue qui témoignera de l'activité de la substance à doser en fonction de la durée de l'expérience. Il suffira de substituer les abcisses des concentrations aux abcisses des temps pour obtenir les résultats du dosage.

Le tableau 1 donne les valeurs de $\frac{C}{C_o}$ en fonction du temps pour diverses valeurs de $\frac{x}{V} = k$.

Il est à noter que sur le plan pratique, pour que la dilution soit homogène dans le récipient contenant le volume V, on ajoute un système d'agitation très simple à réaliser. Il s'agit d'un "bullage" abondant qui est procuré en couplant une arrivée d'air dans le tube d'affusion à raison de 3 ml/mn .

Remarquons que cette technique de dilution exponentielle continue a été également employée par Rylan et coll. (40).

Tableau 1

Valeurs de t	Valeurs du rapport de dilution x/V								
	4,6	2,3	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,05
0 mn	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30 sec	0,1								
1 mn	0,01	0,1	0,40	0,45	0,54	0,68	0,82	0,90	0,95
2 mn	0,0001	0,01	0,16	0,21	0,29	0,45	0,67	0,82	0,90
3 mn		0,001	0,06	0,10	0,16	0,30	0,55	0,75	0,86
4 mn			0,02	0,04	0,18	0,21	0,45	0,67	0,82
5 mn				0,02	0,04	0,15	0,47	0,61	0,78
6 mn					0,02	0,10	0,31	0,55	0,75
7 mn						0,06	0,25	0,50	0,71
8 mn						0,04	0,21	0,45	0,67
9 mn							0,17	0,41	0,64
10 mn							0,14	0,37	0,61
11 mn							0,11	0,33	0,58
12 mn								0,30	0,55
13 mn								0,28	0,53
14 mn								0,25	0,50
15 mn								0,23	0,48

Note: Dans le cas de "dilution exponentielle continue inversée", dans lequel le volume V correspond au diluant auquel on ajoute x ml/mn de réactif dilué à la concentration C_o, la formule donnant la concentration C_t au temps t est :

$C_t = C_o (1 - e^{-(x/V)\ t})$ ou $C_t/C_o = 1 - e^{-(x/V)\ t}$

Pour obtenir les valeurs de ce rapport C_t/C_o, il suffit de retrancher les valeurs données dans le tableau ci-dessus de la valeur 1.

Exemple de calcul : On dose le complément. Dans un tube on place 1,6 ml de tampon et 0,32 ml de sérum de cobaye (C_o = 2 %). On prélève 1,6 ml/mn par le tube de pompe, en même temps, on ajoute dans la dilution de sérum de cobaye 1,6 ml/mn de tampon diluant. Quelle est la concentration en sérum de cobaye à la 6ème minute ? On voit que x/V = 0,1. La colonne 0,1 donne pour 6 mn la valeur 0,55. A ce moment, la concentration est donc 0,55 . 2 % = 1,1 %.

CHAPITRE III

AUTOMATISATION DU DOSAGE DU COMPLEMENT

CONSEQUENCES THEORIQUES

Quelle que soit la substance dosée, le principe de dilution reste identique. Ainsi que nous l'avons vu précédemment, la rapidité de la dilution dépend de la valeur de k, c'est-à-dire du rapport x/V. On utilisera le montage représenté sur la figure n° 2.

Le dosage se fait en présence de l'antigène (prélevé par le tube calibré n° 4) et avec incubation préalable de 30 mn.

Le tube calibré n° 1 ne prélève pas de sérum mais du tampon physiologique.

Le tube n° 2 prélève les dilutions de sérum de cobaye.

A cet effet, le sérum est dilué à une concentration C_o %, sous un volume de V ml (en tampon physiologique). Le tube n° 2 sera d'un calibre correspondant à un prélèvement de x ml/mn mais le tube n° 9 apportera dans cette dilution x ml/mn de tampon physiologique servant de diluant. En conséquence, la concentration en sérum de cobaye au temps t sera égale à

$$C = C_o \cdot e^{-\frac{x}{V} t} .$$

Dans ces conditions, on commence par introduire dans le circuit analytique les hématies sensibilisées. Puis, lorsque l'on a pompé ce réactif le temps nécessaire pour bien marquer la ligne de base des hématies intactes, origine des calculs, on introduira dans le récipient contenant le sérum de cobaye les tubes permettant la dilution et le prélèvement de cette dilution. Le complément, en premier lieu très actif, va induire une hémolyse totale, puis à mesure de sa diminution d'activité par suite de la dilution, l'hémolyse va cesser et cette inhibition va se traduire par une remontée du stylet de l'enregistreur vers l'origine, c'est-à-dire par un retour vers la ligne de base. Dès ce retour, le dosage est terminé.

METHODE DE CALCUL DU POINT C'H 50 - DETERMINATION DE LA QUANTITE DE COMPLEMENT EFFICACE A CE POINT -

Note : On utilisera la table n° 1 (page 34) dans laquelle, en fonction du temps exprimé en minutes et de la raison $k = \frac{x}{V}$ de la dilution utilisée, on obtient la valeur du quotient $\frac{C}{C_o}$.

Soit A la valeur en densité optique de la ligne de base,
soit B la valeur en densité optique du point d'hémolyse totale,
A - B = la valeur en densité optique de l'hémolyse

$\frac{A - B}{2}$ = la valeur du point d'hémolyse 50 % et

$\frac{A - B}{2} + B$ = le point d'hémolyse 50 % sur la courbe.

$C = 2.5 . e^{-0.1ot}$

$V = 8\ ml$

$C_0 = 2.5\ \%$

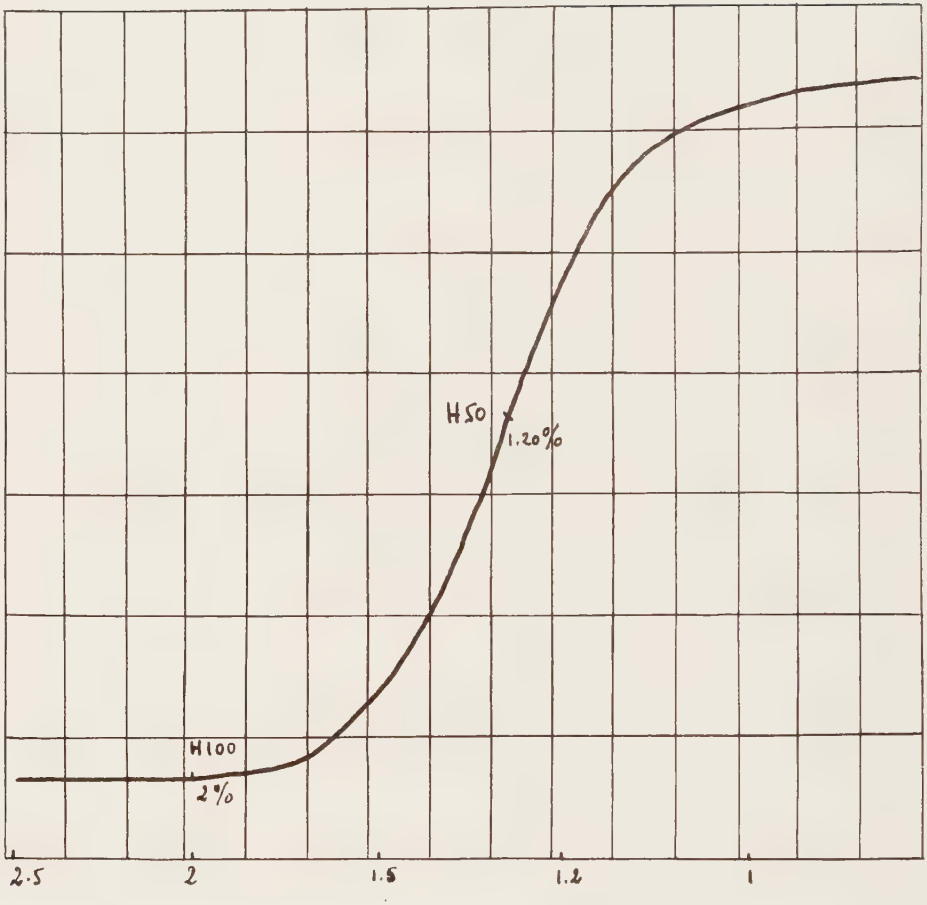


Fig. 3 -

COURBE DE TITRAGE DU COMPLEMENT PAR DILUTION EXPONENTIELLE CONTINUE

DETERMINATION DE C'H50

METHODE DIRECTE

$C' = 1\% \left(e^{-0.2t}\right)$

$C'H50 = 0.17\%$

METHODE INVERSEE

$C' = 0.5\% \left(1-e^{-0.2t}\right)$

$C'H50 = 0.20\%$

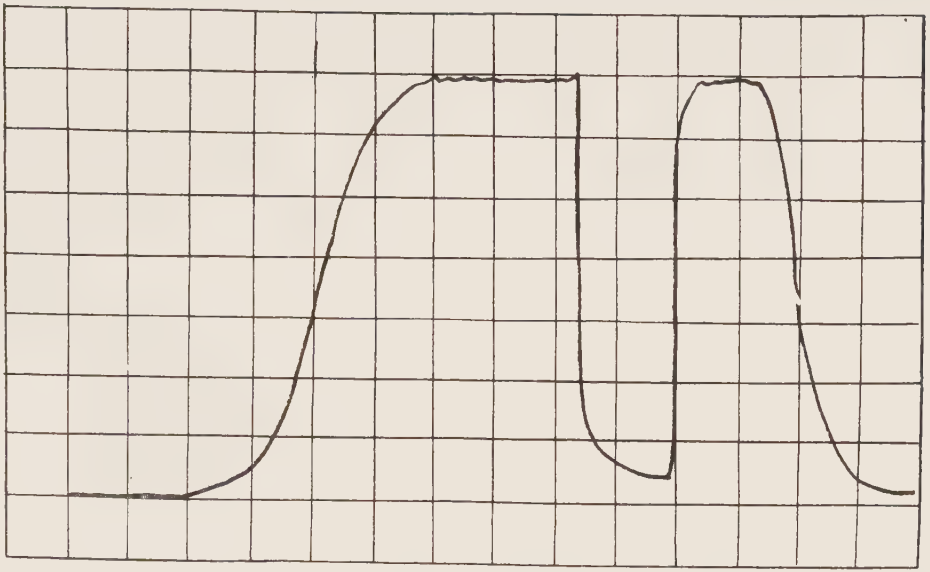


Fig. 4 - TITRAGE DU COMPLEMENT PAR METHODE DE DILUTION EXPONENTIELLE CONTINUE DIRECTE ET PAR METHODE DE DILUTION EXPONENTIELLE CONTINUE INVERSEE

On connaît le temps qui est donné par le défilement du papier de l'enregistreur, 18 pouces anglais par heure soit une division du papier pour 100 secondes (pignons 24/72). On trace à partir du point d'inflexion de la ligne de base la parallèle à l'axe du temps. Puis, à partir du point H 50, la perpendiculaire à cet axe. On mesure en millimètres la longueur de ce segment qui va donc exprimer en millimètres le temps nécessaire pour l'obtention du point d'hémolyse 50 %. Une règle de trois va nous donner l'équivalence des millimètres en secondes. Ce temps en secondes sera converti en minutes afin d'homogénéiser les temps qui sont exprimés en minutes, en ce qui concerne les débits des tubes de pompe.

Connaissant :

1°) la concentration initiale en C' = C_o

2°) le rapport $\frac{x}{V}$ du système de dilution adopté

3°) le temps en minutes d'obtention du point H 50 la table donnant $\frac{C}{C_o} = x$ nous donne la concentration du complément actif au point d'hémolyse 50 % (C'H 50).

Il faut signaler enfin que ce procédé peut être utilisé avec la méthode dite "inversée" en prélevant au temps zéro du tampon physiologique et en enrichissant progressivement cette solution tampon en sérum de cobaye x. Dans ce cas, la concentration au temps t est donnée par la formule

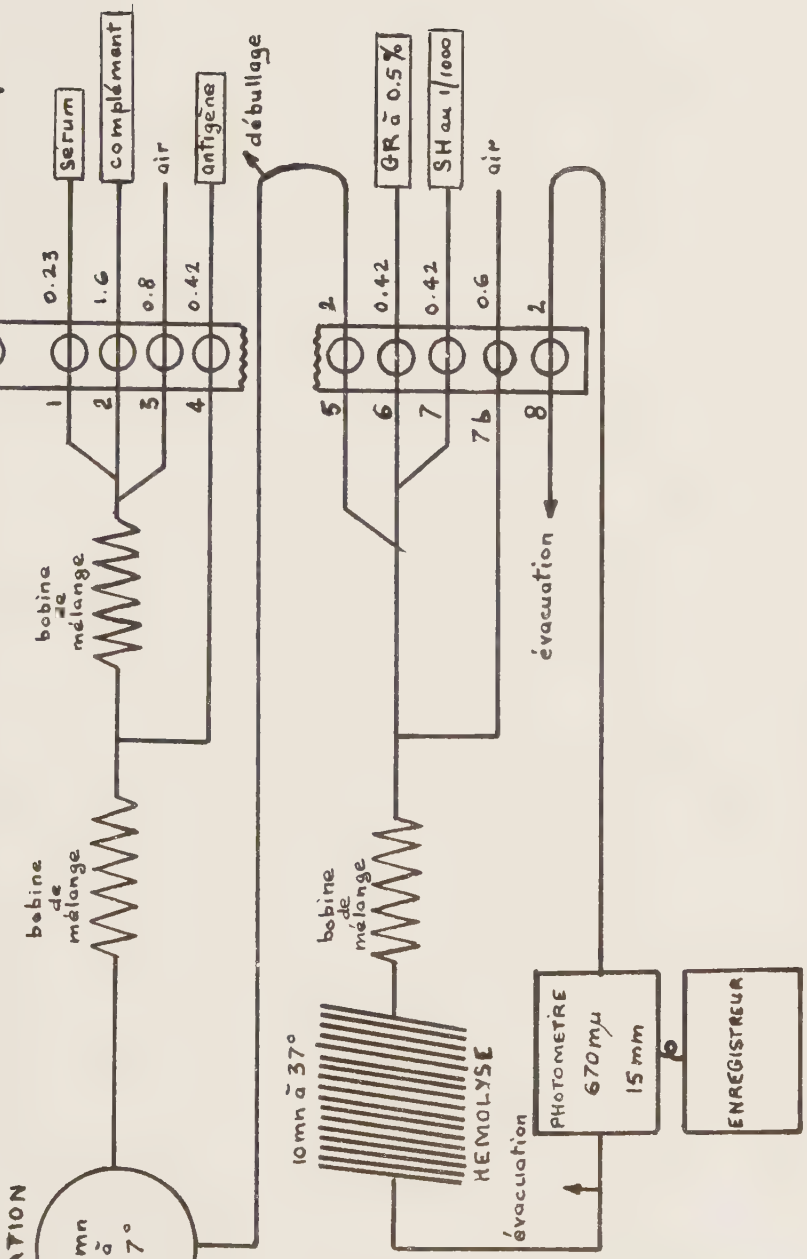
$$C_t = C_o \ (1 - e^{-(\frac{x}{V})t})$$

Quel que soit le processus utilisé, l'enregistreur fournit une courbe sigmoïde d'où il est aisé de tirer la valeur de 1 unité C'H 50 (Fig. 3).

Remarque : Quelle que soit la substance dosée, le principe de dilution reste identique. La rapidité de la dilution dépend de la valeur de k, c'est-à-dire du rapport $\frac{x}{V}$. Selon les cas, on choisira une faible valeur de k, de l'ordre de 0,1 à 0,05 si l'on recherche la précision, ou au contraire une forte valeur si l'on recherche la rapidité du dosage.

D'autre part, dans tous les cas on pourra utiliser soit la méthode de dilution par tampon-diluant, soit la méthode, dite "inversée", d'enrichissement du tampon physiologique par un diluant concentré. Quelle que soit la méthode adoptée, les résultats obtenus seront identiques. Cependant, il va de soi que la première de ces méthodes sera d'un emploi plus économique au laboratoire, car elle épargnera des réactifs onéreux (Fig. 4).

Fig. 2 - SCHEMA DE MONTAGE DE L'ENSEMBLE ANALYTIQUE AUTOMATIQUE UTILISE DANS LES REACTIONS DE FIXATION DU COMPLÉMENT



Exemples de dosages :

Le tableau suivant donne des exemples de calculs de la concentration de complément donnant une hémolyse de 50 % :

C_o	K	Temps H_{50}	$-0,43kt$	$\log_{10}\frac{C}{C_o}$	$\frac{C}{C_o}$	C'H 50
2 %	0,1	25 mn	- 1	- 1	0,1	0,2 %
0,5 %	0,1	8 mn	- 0,34	- 1,66	0,45	0,22 %
0,4 %	0,05	12 mn	- 0,26	- 1,74	0,55	0,22 %

ETUDE DES COURBES DE TITRAGES

Toutes les courbes de titrage ont le même aspect en S. Ces courbes sont très régulières si on prend soin d'agiter le contenu de R afin qu'à tout instant la dilution du complément soit homogène. Comme nous l'avons vu, la forme de la courbe en S dépend du mode de dilution et des rapports volume/prélèvement. Nous savons que quelles que soient les modalités techniques, les résultats quantitatifs sont identiques. Cependant, ces résultats cessent d'être identiques dès que l'on modifie la durée du temps d'hémolyse ou bien la température du dispositif thermostaté.

Le calcul simple décrit ci-dessus nous permet de déduire la quantité de complément correspondant à une unité C'H 50. En fait, si le point H 50 est facilement défini, il n'en est pas de même des points H 100 ou H 0. La signification de cette imprécision sera abordée plus loin.

Remarque : L'appareillage ne fournit pas des courbes en coordonnées linéaires : l'axe des x, linéaire en fonction du temps est exponentiel en fonction des concentrations. L'axe des y, linéaire pour le pourcentage de transmission lumineuse, est logarithmique pour la quantité d'hématies. Dans ces conditions, il est nécessaire de relever les points expérimentaux et de reporter ces valeurs soit sur papier millimétré à échelles linéaires, soit sur papier bi-logarithmique, soit papier logarithmique probit. Dans ces conditions, il sera possible d'analyser la signification de la courbe en S.

lère hypothèse :

Application de la formule de Von Krogh. En 1916, Von Krogh (54) a pensé pouvoir appliquer la loi d'absorption en la modifiant pour décrire des phénomènes rattachés alors à la physique des colloïdes comme l'agglutination bactérienne, les précipitations de l'ovalbumine par les cations divalents, l'hémolyse des hématies sensibilisées par le complément.

De ce travail, il a été retenue la formule classique

$x = k\left(-\frac{Y}{1-Y}\right)^{\frac{1}{n}}$ ou x = la quantité de complément
Y = le pourcentage de lyse
k = la quantité de complément entraînant la lyse de 50 % des hématies.

$\frac{1}{n}$ est une constante obtenue en portant les valeurs x et $\left(-\frac{Y}{1-Y}\right)$ sur papier bi-logarithmique. La valeur 1/n est fonction de divers facteurs, en particulier de la concentration en hématies (Kent 18,19).

Dans l'expérience qui nous servira d'exemple k = 0,46 et $\frac{1}{n} = 0,15$.

Or, si on calcule x pour les diverses valeurs de Y, les résultats obtenus ne sont pas superposables aux valeurs expérimentales si Y est supérieur à 0,8.

En effet, la courbe qui donne l'équation de Von Krogh n'est pas symétrique par rapport au point H 50 et fournit pour x des valeurs supérieures aux valeurs fournies par l'expérience quand on est au voisinage du point H 100. Plus la valeur de $\frac{1}{n}$ augmente, plus s'accentue la disparité des résultats.

Il a été vérifié sur 40 courbes de dosage, que la loi de l'absorption convient très bien pour les valeurs de Y inférieures à 80 %, mais non au-delà. Or, entre 20 et 80 %, la loi d'absorption masque une équation linéaire simple, quand les valeurs de $\frac{1}{n}$ sont voisines de 0,20.

C'est pourquoi, une deuxième hypothèse a été considérée.

Seconde hypothèse :

Linéarité de la relation entre quantité de complément et intensité de la lyse.

Nous constatons graphiquement que, en fait, pour une hémolyse comprise entre 20 et 80 %, la courbe de titrage peut être assimilée à une droite de formule x = ay + b ou x est la quantité de complément

y le degré de lyse

a est la pente de la droite (de valeur comprise entre 0,20 et 0,40)

et b une constante qui correspond au point théorique d'hémolyse zéro (HO). (Fig. 5).

Soit notre exemple où a = + 0,25
et b = + 0,33

Le calcul des valeurs de x à partir de cette formule est au moins aussi satisfaisant que celui que nous donne l'application de la loi d'absorption et couvrira l'intervalle compris entre 10 % d'hémolyse et 90 % d'hémolyse.

Dans ces conditions, on peut dire que dans des limites comprises entre le H 50 + 30 % la quantité d'hématies lysée est linéairement proportionnelle à la quantité de complément mis en jeu. Cette hypothèse est simple et donne des valeurs calculées proches des valeurs expérimentales.

Troisième hypothèse :

La courbe de titrage en S correspond à une courbe stastistique :

Tableau 2

Degré de l'hémolyse y	Concentration en sérum de cobaye (x)		
	réelle	calculée	
		Formule de Von Krogh (1)	Formule linéaire (2)
0,9	0,57	0,64	0,56
0,8	0,54	0,57	0,54
0,7	0,51	0,53	0,51
0,6	0,48	0,49	0,48
0,5	0,46	0,46	0,46
0,4	0,44	0,44	0,43
0,3	0,41	0,41	0,41
0,2	0,38	0,38	0,38
0,1	0,34	0,33	0,35

(1) formule $x = 0,36 \left(\frac{Y}{1 - Y}\right)^{0,15}$

(2) formule $x = 0,25\ y + 0,33$

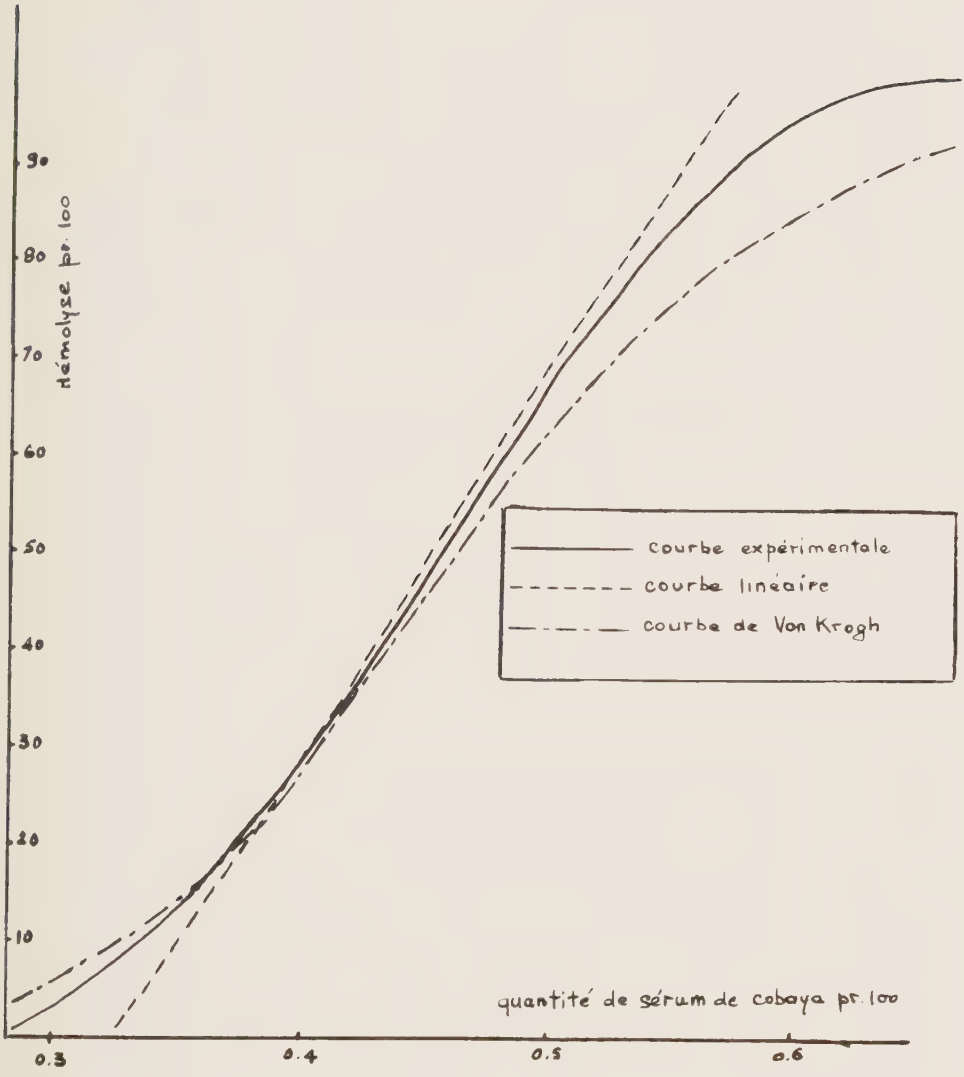


Fig. 5 - COMPARAISON DES COURBES D'HEMOLYSE EN FONCTION DE LA QUANTITE DE SERUM DE COBAYE

Si nous admettons que la courbe de titrage est assimilable à une droite, il devient évident que si des quantités de complément inférieures au point théorique H O peuvent lyser de 1 à 10 % des hématies, c'est que la suspension globulaire n'est pas homogène et qu'elle renferme des hématies particulièrement sensibles à la lyse. De même, ou inversement, si des quantités supérieures au point théorique H 100 ne lysent que 90 à 99 % des érythrocytes, c'est que certains d'entre eux sont particulièrement résistants à cette lyse. Et nous pourrons alors dire que les courbes en S traduisent l'hétérogénéité de la population globulaire, soumise à la lyse. Remarquons que cette interprétation statistique fut introduite dès 1919 par Brooks (8), reprise par Morris (27) et utilisée par Roulier (39). Nous avons d'ailleurs vérifié expérimentalement que l'on atteint pratiquement le point H 100 donné par la formule du 1er degré, en travaillant avec une suspension de globules vieillis par conservation pendant 15 jours à 8°, et devenus par ce fait particulièrement fragiles.

Conclusion :

Il est possible d'obtenir par le procédé de la dilution exponentielle continue des titrages exacts, précis et reproductibles du complément.

Les courbes de titrages obtenues montrent que la formule de Von Krogh, basée sur la loi d'absorption ne décrit pas complètement le phénomène. Il semble en fait que le degré d'hémolyse est proportionnel à la quantité de complément mis en oeuvre. La courbe en S traduit par ses extrémités infléchies l'hétérogénéité de la population globulaire soumise à la lyse.

DETERMINATION DE LA DOSE DE COMPLEMENT A UTILISER DANS LES REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT.

Classiquement (38, 10) les réactions de fixation du complément se font en déterminant le point d'hémolyse H 100, par la méthode des échantillonnages (technique dite "Titrage du complément du jour"). La dose de complément utilisée dans la réaction de fixation du complément proprement dite est fixée à deux unités. Dans la technique originale de Kolmer (21) cette quantité est même portée à deux "full units".

Cet excès de complément est employé parce que la pratique a montré qu'une unité s'avère souvent une quantité insuffisante, soit que une partie du complément est inactivée spontanément pendant le temps de fixation, soit que le sérum chauffé à 55° exerce une action inhibitrice de l'hémolyse.

L'empirisme des méthodes manuelles tient encore au fait du mode de lecture peu précis des résultats du titrage du complément (cette

lecture se fait généralement sans dispositif photométrique).

Nous avons préféré nous référer au point d'hémolyse 50 %. La dose de complément que nous utiliserons par la suite est fixée empiriquement à deux fois et demie la concentration C'H 50. En effet, d'une manière très constante, les courbes de titrage du complément montrent que une unité C'H 100 égale 1,6 unité C'H 50 (17 p. 139 table 3).

Par conséquent en utilisant 2,5 unités C'H 50, on se trouve dans des conditions de meilleure sensibilité que dans les réactions classiques qui utilisent plus de 3,2 unités C'H 50.

Précisons que, selon nous, l'appareillage automatique permettra de mieux préciser la dose de complément nécessaire et suffisante pour une sensibilité optimale des réactions de fixation. Des recherches en cours semblent indiquer que l'AutoAnalyseur permet de travailler avec moins de une unité C'H 100, ce qui donne à la réaction de fixation une sensibilité maximale.

CHAPITRE IV

DOSAGE AUTOMATIQUE DES ANTIGENES

I - PRINCIPES DE LA METHODE

Il s'agit de mettre en contact les mêmes réactifs que lors de l'emploi d'une technique manuelle. Là encore, la différence de méthode va provenir de l'introduction de la possibilité d'obtenir en lieu et place d'un certain nombre d'informations fragmentaires, une courbe continue traduisant la variabilité de la concentration de la suspension antigènique.

Cette variabilité nous sera apportée par l'utilisation d'un système de dilution continue en tous points analogue en son principe au système précédemment décrit.

II - DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE MIS EN OEUVRE

L'équipement utilisé à ce stade est représenté schématiquement sur la figure 2, page 37.

Il faut utiliser le circuit de manière à obtenir un temps de fixation de 30 mn à 37° par le moyen du bain-marie thermostaté. Le système de dilution exponentielle continue sera appliqué au récipient contenant l'antigène.

III - DEROULEMENT DE L'EXPERIENCE

Dans un premier temps, une unité de complément C'H 100 est mélangée avec une quantité fixe d'immun-sérum (anticorps) et avec une quantité variable d'antigène à titrer, la variabilité étant apportée par la dilution automatique.

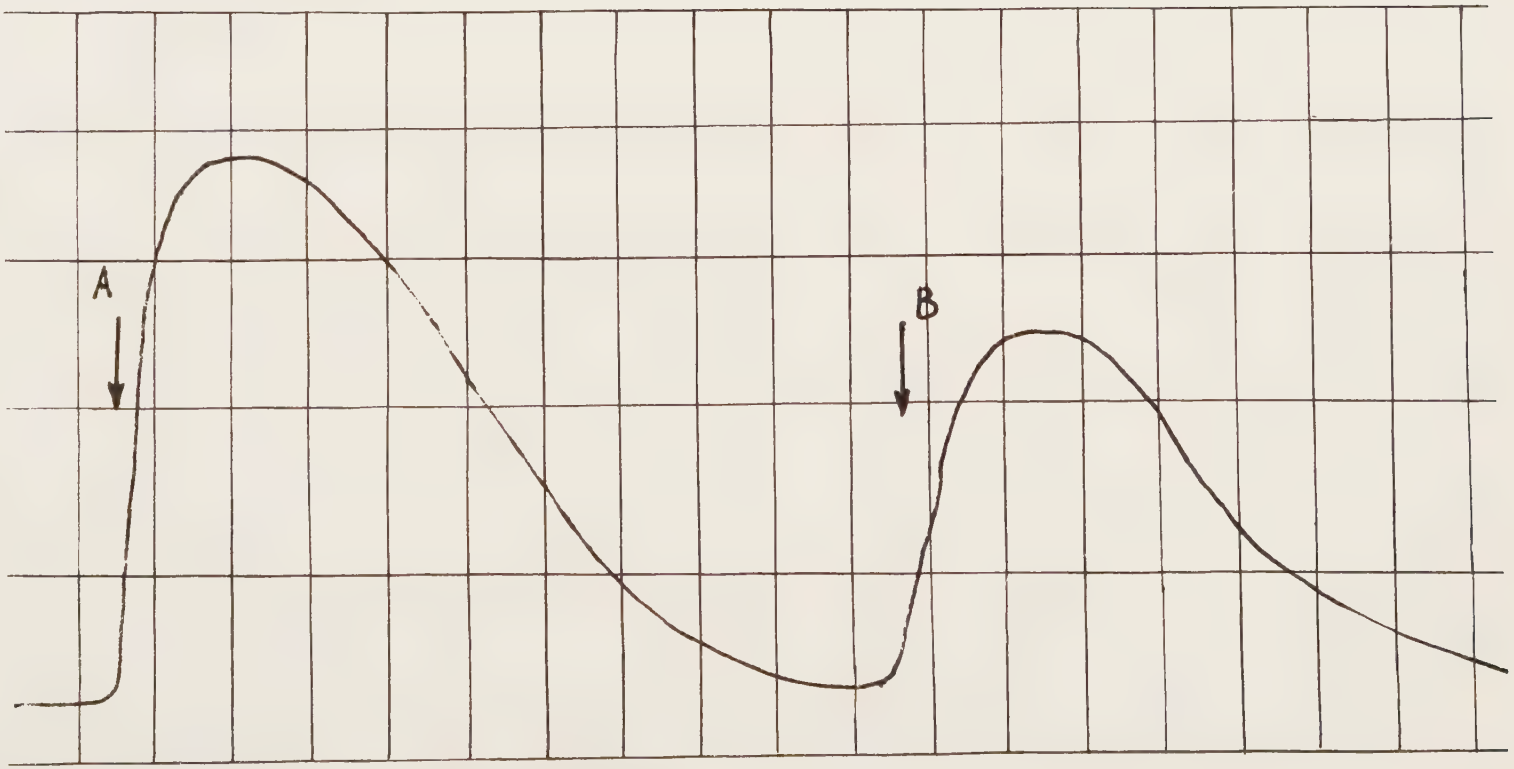
Ce premier stade va se dérouler à 37° durant 30 mn. Après quoi, on va ajouter au flux sortant du premier système thermostaté, durant le stade hémolytique, une quantité fixée d'hématies sensibilisées, de manière à apprécier la quantité de complément libre, c'est-à-dire non fixée durant la première partie de l'expérience.

Là encore, le complément disponible va déterminer l'hémolyse des hématies sensibilisées et cette hémolyse sera appréciée par rapport à une ligne de base obtenue par pompage des hématies sensibilisées en l'absence de complément. Les courbes obtenues seront des courbes analogues à celles que nous avons déjà rencontrées, allant de l'hémolyse complète à l'inhibition complète en cas d'utilisation de la méthode directe de dilution et, inversement, de l'inhibition de l'hémolyse à l'hémolyse complète, en cas d'utilisation de la méthode dite "inversée" (enrichissement d'un tampon physiologique initialement pourvu d'une solution riche en antigène).

Fig. 6 - DOSAGE COMPARATIF DE DEUX FABRICATIONS D'ANTIGENES TREPONEMIQUES

en A $C = 1/5\,(e^{-0.3t})$

en B $C = 1/10\,(e^{-0.3t})$



Les deux méthodes sont exactement superposables quant à la qualité et à l'identité des résultats fournis.

IV - PREPARATION DES REACTIFS

Toutes les dilutions en suspension sont faites en tampon physiologique de Mayer et Lévine (pH 7,4 contenant des ions Ca^{2+} et Mg^{2+}).

La quantité de complément correspondant à une unité C'H 100 est déterminée par titration automatique (voir chapitre précédent).

L'antisérum est obtenu soit à partir d'animaux (par immunisation active), soit par prélèvement chez le malade. Il est nécessaire, pour la titration d'antigène d'opérer en excès d'anticorps.

Le système hémolytique est obtenu en prélevant 0,42 ml d'une suspension d'hématie à 0,5 % et 0,42 ml/mn de sérum hémolytique dilué au 1/1 000.

V - APPLICATION DU TITRAGE AUTOMATIQUE DES ANTIGENES

Nous avons appliqué la méthode à différents antigènes.

1°) Antigènes cardiolipidiques

2°) Antigènes tréponémiques : (souche de Reiter)

Nous avons, à ce propos, effectué des comparaisons de deux fabrications différentes de cet antigène et avons pu constater une certaine différence d'activité. Il est à noter qu'avec cet antigène, on observe toujours un phénomène de zone, quel que soit l'antisérum utilisé (antisérums d'origine humaine dilués au 1/50) (Fig. 6).

3°) Virus aphteux

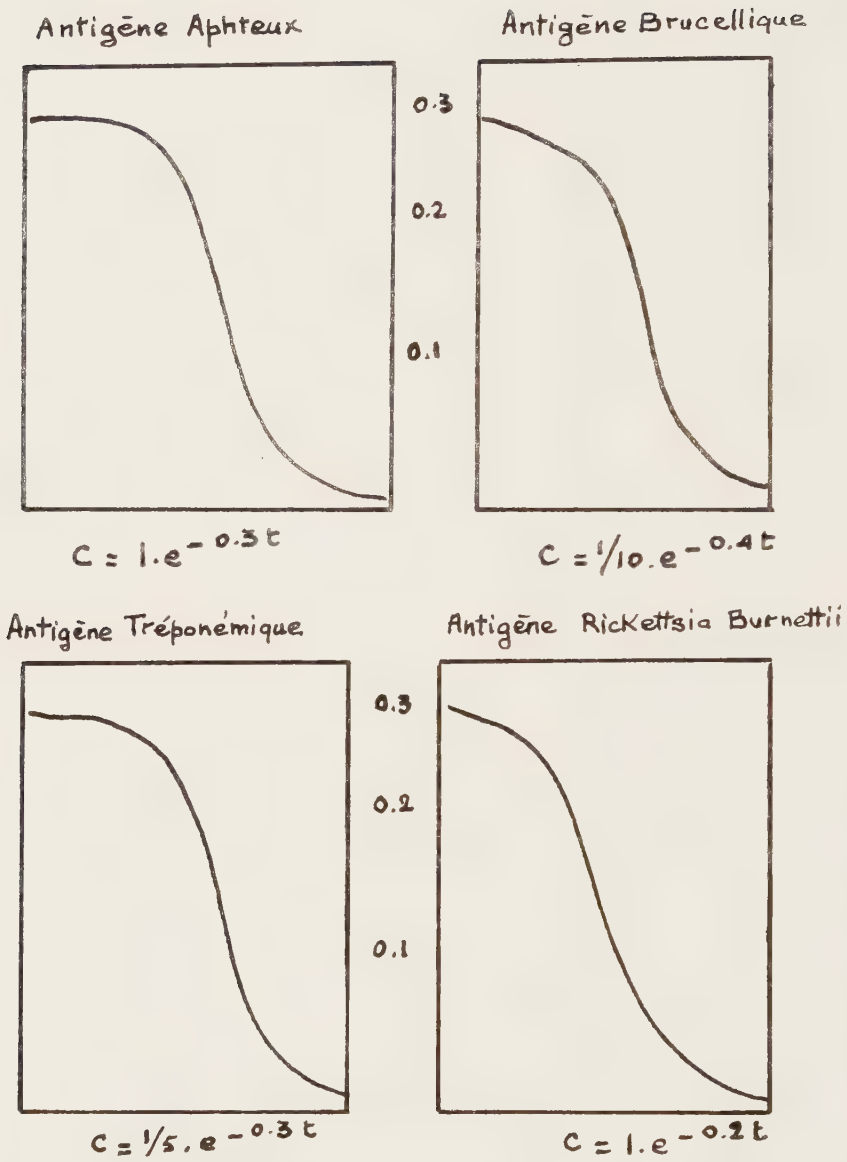
Le vaccin anti-aphteux est fait de virus de souche A, C et O, cultivés sur épithélium lingual du boeuf et titrés par réaction de fixation du complément.

L'antisérum correspondant provient de l'hyperimmunisation du cobaye. Les antisérums sont dilués au 1/100 (Fig. 7).

4°) Antigènes brucellique

Obtenus par culture en gélose. L'antisérum est d'origine animale et est dilué au 1/200 (Fig. 7).

Fig. 7



EXEMPLE DE COURBES DE TITRAGE OBTENUES LORS DE LA TITRATION PAR DILUTION EXPONENTIELLE CONTINUE DE DIFFERENTES SUSPENSIONS ANTIGENIQUES

5°) Ricketsia burneti

L'agent de la fièvre du Queensland, cultivé sur sac vitellin de poulet. L'antisérum correspondant est obtenu par hyperimmunisation du lapin (Fig. 7).

Dans chaque cas, la concentration initiale C_o et la valeur de $\frac{x}{V}$ sont choisis en fonction de l'activité antigénique.

Toutes les courbes ont la forme d'un S renversé, sans phénomène de zone.

Par cette méthode, on obtient une détermination exacte de l'activité d'une préparation antigénique en 40 mn. Il est donc possible ainsi de réaliser des contrôles précis et rapides de la production de ces préparations. La méthode peut être utilisée pour comparer les activités de diverses productions, ou de différents lots de fabrication.

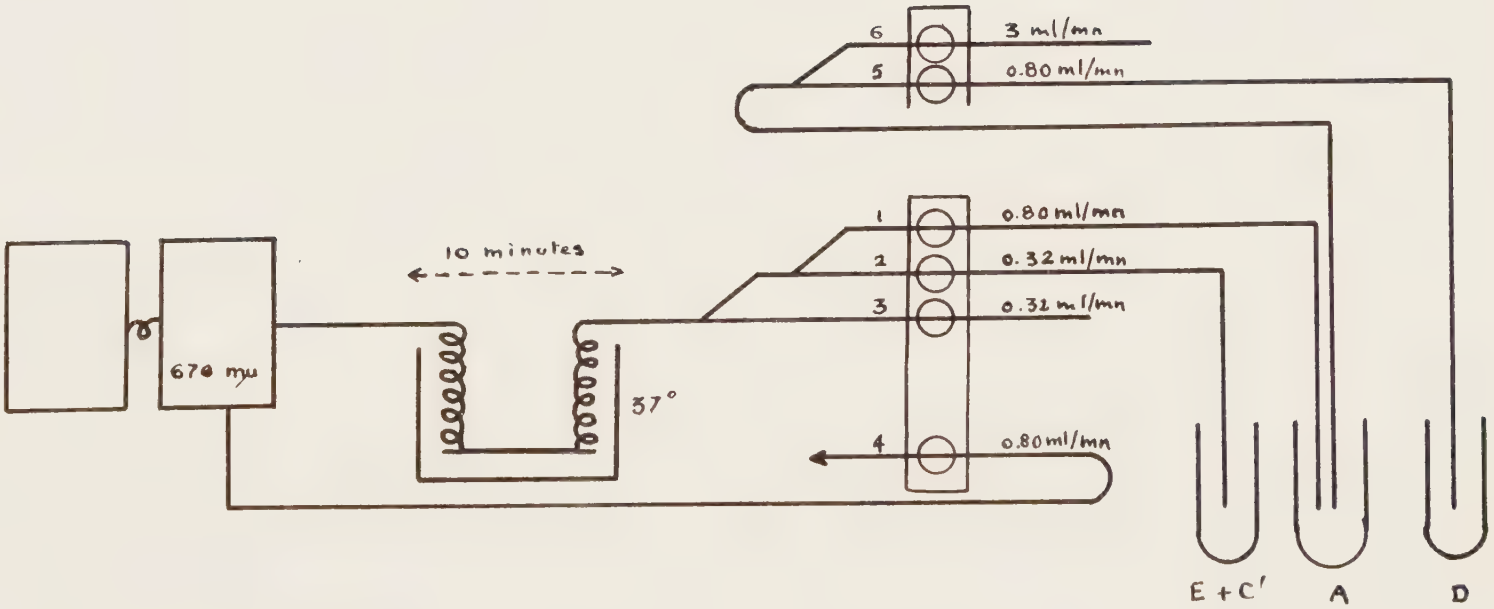


Fig. 8 - SCHEMA DE L'APPAREILLAGE UTILISE POUR LE TITRAGE DE L'HEMOLYSINE

CHAPITRE V

AUTOMATISATION DES TITRAGES DES ANTICORPS

De même que nous venons de montrer comment on peut automatiser les titrages d'antigènes, de même nous allons montrer qu'il est possible de doser automatiquement les anticorps dont l'activité se mesure grâce à une réaction d'hémolyse. Nous verrons que cette méthode automatique, plus sensible et plus reproductible que la méthode manuelle, permet une facile observation des phénomènes de zone. Enfin nous comparerons les résultats des titrages avec les données de la cinétique de la réaction de fixation du complément.

Deux types d'anticorps peuvent se doser selon notre procédé automatique :

a) les hémolysines (ambocepteur anti-hématies) des sérums hémolytiques,

b) les anticorps fixant le complément.

I - DOSAGE DES HEMOLYSINES

Nous prendrons pour type le dosage des hémolysines anti-hématies de mouton. Nous avons utilisé 3 types de sérum hémolytique : le sérum hémolytique "Byolyon" à 2 000 unités, le sérum hémolytique de l'Institut Pasteur et, principalement, un sérum hémolytique que nous a fourni le Docteur Laporte, Chef de Service à l'Institut Pasteur; ce dernier sérum est riche en macroglobulines hémolytiques et ne contient que des agglutinines hétérophiles.

1°) Appareillage

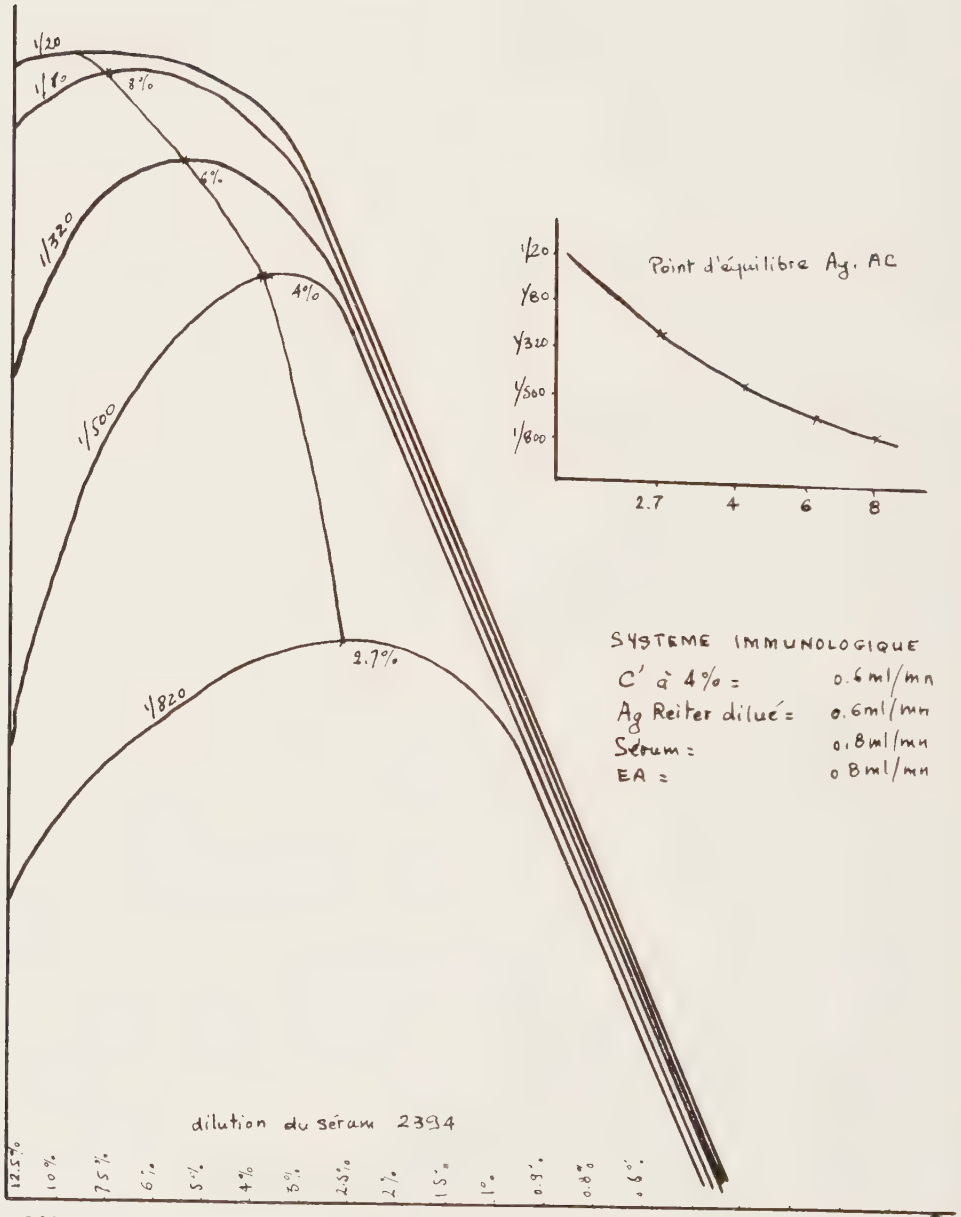
Il s'agit d'une simple réaction d'hémolyse, donc le montage est particulièrement facile (47) (Fig. 8).

Un récipient reçoit la suspension d'hématies et le complément en excès. On prélève 0,32 ml/mn du contenu de ce récipient appelé "E + C' ".

Un 2ème récipient reçoit la dilution de sérum hémolytique. Cette dilution est supérieure à celle qui correspond à une unité hémolytique. On prélève 0,8 ml par minute de ce récipient appelé "A" (= ambocepteur). Mais on dispose d'un troisième récipient contenant du tampon physiologique. Ce tampon est amené dans le récipient A à raison de 0,8 ml par minute. Par conséquent, le volume dans le récipient A reste constant. Si le sérum hémolytique se trouvait initialement à une dilution SH 0 %, sous un volume V, la dilution au temps t est donnée par la formule :

$$\text{Dilution au temps } t = SH\ 0\ \% \ .\ e^{-0,8/V.t}$$

$$\text{ou encore } \log \frac{SH_t}{SH_o} = -\ 0,43\ \frac{0,8}{V}\ t$$



DOSAGE DU SERUM 2394 EN PRESENCE DE DIVERSES DILUTIONS D'ANTIGENES TREPONEMIQUES DE REITER

Fig. 10

En donnant à V des valeurs convenables, on peut avoir différentes vitesses de dilution.

Remarquons encore que le récipient A peut contenir au début du dosage du tampon physiologique sous un volume V, et qu'on peut enrichir cette concentration "zéro" en amenant 0,8 ml par minute d'une dilution de sérum hémolytique. Dans ce type de dilution, la formule devient là encore :

$$\text{Dilution au temps } t = SH_t = SH_o \ (1 - e^{-0,8/V.t})$$

Quel que soit le système de dilution du sérum hémolytique, la suite du montage est identique. Les deux tubes de prélèvement E + C' et A sont rassemblés à la sortie de la pompe, ou segmente par de l'air (0,32 ml/mn d'arrivée d'air).

Les échantillons sont envoyés dans deux serpentins plongés à 37°. Le temps de traversée des serpentins dépend de la longueur de ceux-ci. Ce temps correspond au temps de réaction pendant lequel s'effectue la combinaison EAC' qui aboutit à une hémolyse plus ou moins complète selon la concentration de A (= sérum hémolytique) puisque les deux autres éléments E et C' sont en quantité constante.

A la sortie des serpentins, les échantillons pénètrent dans la cuve du photomètre. Le degré de lyse est enregistré sur papier semi-logarithmique.

La vidange de la cuve photométrique est faite par un tube de pompe de 0,8 ml par minute, le trop-plein, entraînant les bulles d'air, est éliminé avant l'entrée dans la cuve du photomètre.

2°) Résultats des dosages des hémolysines

Les graphiques fournissent des courbes sigmoïdes.

1er type : Le récipient A contient, au début de l'expérience, un excès d'hémolysine. La courbe débute donc par un tracé correspondant à une densité optique de 0,05. Il y a donc hémolyse totale. Quand la quantité d'hémolysine devient trop faible, la courbe s'infléchit, le tracé montre une augmentation de la densité optique. Enfin, quand la quantité de sérum hémolytique est trop faible, le tracé indique une densité optique de 0,40 soit hémolyse zéro.

2ème type : Le récipient A contient en début de titrage du tampon physiologique. On a un graphique inversé commençant à hémolyse zéro, aboutissant à hémolyse 100 %.

Dans l'un et l'autre cas, le point caractéristique est le point d'hémolyse 50 %.

3°) Vérification des propriétés hémolytiques du sérum - Sensibilisation optimale des hématies :

On sait que les sérums anti-Forsman possèdent une concentration-seuil. Au-dessous de cette concentration, l'hémolyse est proportionnelle à la quantité d'hémolysine selon une loi hyperbolique. Mais au-dessus de ce seuil, un accroissement en hémolysine n'augmente plus la quantité de cellules lysées, la courbe reste en plateau. Ces sérums hémolytiques permettent donc de définir la "sensibilisation optimale". C'est la plus faible valeur d'hémolysine permettant d'atteindre le plateau de la courbe "hémolysine/complément".

Au contraire, les sérums contenant des anticorps isophiles fournissent des courbes qui ne comportent aucun "plateau" : à toute augmentation en hémolysine correspond une augmentation en nombre d'hématies lysées. De tels sérums ne peuvent servir à des mesures précises sur l'activité du complément.

Notre appareillage convient parfaitement à l'obtention de ces courbes qui permettent de juger de la valeur d'une préparation de sérum hémolytique. Il suffit en effet de reprendre le mode de titrage décrit au paragraphe précédent en utilisant cette fois 0,6 à 0,8 unités C'H 100, de telle sorte que, en aucun cas, on n'obtiendra une hémolyse totale. On a intérêt, dans ces essais, à utiliser une plus forte concentration en globules, de telle sorte que, en excès d'hémolysine, l'hémolyse donnée par le complément (moins de une unité) fournisse une densité optique de 0,50 environ.

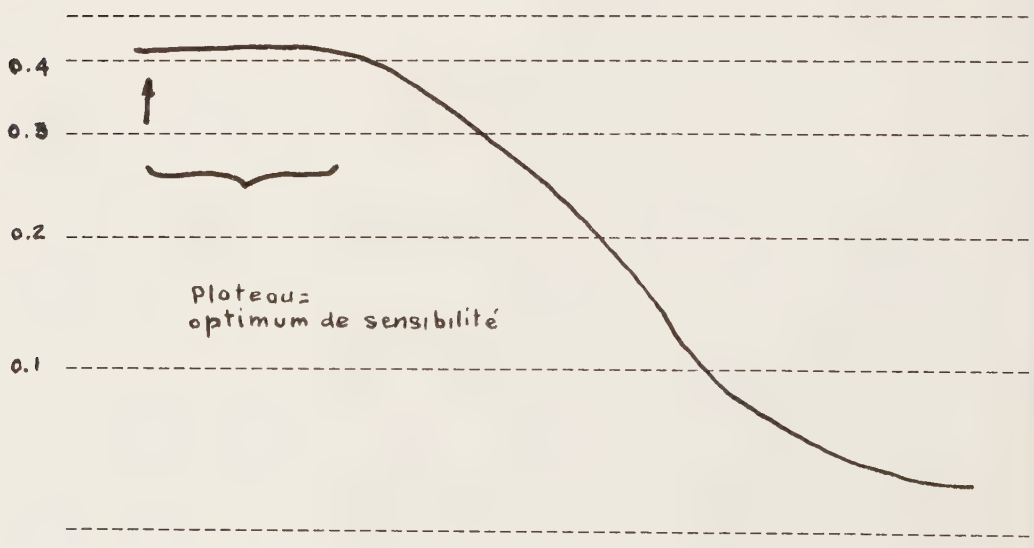


Fig. 9

Dans la figure précédente, la concentration initiale en SH était égale à 1/100, le rapport x/V = 1,16 (soit V = 0,69 ml). Ainsi, à 2 mn la concentration est 1/1 000, à 4 mn concentration = 1/10 000, à 8 mn concentration = 1/100 000.

On peut également contrôler le caractère Forsman des sérums hémolytiques en répétant des dosages automatiques de complément (cf chapitre III) en présence de diverses concentrations de sérums hémolytique. Le sérum fourni par le Docteur Laporte nous a donné les résultats suivants :

Dilution du SH		Valeur de t pour H 50	Concentration utile de complément
utilisée	dans volume total		
1/20	1/56	5 mn 20 s.	0,35 %
1/80	1/224	5 mn 20 s.	0,35 %
1/320	1/900	5 mn 20 s.	0,35 %
1/1 000	1/2 800	5 mn 20 s.	0,35 %
1/4 000	1/11 200	5 mn 20 s.	0,35 %
1/16 000	1/45 000	3 mn 20 s.	0,50 %
1/60 000	1/168 000	1 mn	0,82 %

Ce sérum est donc particulièrement actif, puisque le "plateau" de sensibilisation des hématies s'étend de 1/20 au 1/4 000.

(Signalons que la formule de dilution du complément était égale à $1\ \% \cdot e^{-0,2\,t}$).

II - DOSAGE DES ANTICORPS FIXANT LE COMPLEMENT

Le principe du dosage automatique est exactement le même que celui mis en oeuvre dans les techniques manuelles des échantillonnages. Des quantités variables de sérum contenant des anticorps spécifiques sont mises en présence d'une quantité fixe d'antigène et d'une quantité fixe de complément (une unité C'H 100). Les mélanges sont laissés à 37° pendant 30 minutes, puis on dose le complément non fixé à l'aide d'un système hémolytique.

1°) L'appareillage

Le montage de l'AutoAnalyseur est celui qu'on utilise soit pour les réactions de Bordet-Wassermann en séries continues, soit pour le titrage des antigènes. Dans le cas étudié ici, le système de dilution aboutit au récipient contenant le sérum dont on veut doser l'activité anticorps; par conséquent, les quantités d'anticorps vont varier progressivement selon la loi exponentielle des dilutions continues. Si la prise d'essai contient un excès d'anticorps, il y a fixation totale et l'enregistreur indique l'absence d'hémolyse. Si la prise d'essai correspond à un sérum trop dilué, la dilution ne contenant pas assez d'anticorps, il y a absence de fixation et l'enregistreur indique l'absence d'hémolyse. Si la prise d'essai correspond à un sérum trop dilué, la dilution ne contenant pas assez d'anticorps, il y a absence de fixation et l'enregistreur indique une hémolyse totale. Entre ces deux valeurs extrêmes, tous les points intermédiaires sont obtenus, l'enregistreur fournit donc une courbe de dosage de forme sigmoïdale.

2°) Application de la méthode de titrage des anticorps

Comme exemple nous prendrons un sérum syphilitique dans lequel nous avons dosé les anticorps vis-à-vis de l'antigène de Reiter en utilisant 6 dilutions antigéniques différentes : 1/20, 1/80, 1/320, 1/500, 1/800. Le sérum 2 394 est un sérum provenant d'un cas de syphilis primaire. La formule de dilution du sérum a été :

$$\text{dilution au temps } t = 1/8 \cdot e^{-0,2\,t}$$

Dans le tableau suivant, nous reportons les résultats de la lyse en fonction du temps, c'est-à-dire en fonction de la concentration en sérum :

	0 mn	2 mn	4 mn	6 mn	8 mn	10 mn	12 mn	14 mn	16 mn	18 mn
Reiter	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{12}$	$\frac{1}{18}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{37}$	$\frac{1}{56}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{120}$	$\frac{1}{\infty}$	$\frac{1}{\infty}$
au 1/20	100	100	100	95	85	50	20	0	0	0
1/80	90	100	100	98	90	60	20	0	0	0
1/320	80	85	90	90	80	55	20	0	0	0
1/500	30	50	60	80	80	50	20	0	0	0
1/800	15	20	25	30	35	40	20	0	0	0

Ces chiffres sont extraits des graphiques donnés dans la figure n° 10. Ils montrent que le titre d'un sérum dépend de la dilution antigénique utilisée. Mais ils montrent en outre que le maximum de fixation dépend du rapport entre la quantité d'antigène et la quantité d'anticorps. Avec les dilutions situées au-delà du 1/320, le phénomène de zone est particulièrement net. Pour le sérum étudié, on peut déterminer les équivalences suivantes : Maximum de fixation pour :

antigène	sérum
1/20	1/10
1/80	1/15
1/320	1/20
1/500	1/33
1/800	1/60

Des titrages de sérums ont été effectués selon le même principe pour le dosage des réagines actives sur la cardiolipine, des anticorps anti-aphteux, antibrucelliques, anti-salmonelles.

3°) Titrage discontinu des anticorps

L'AutoAnalyseur permet de réaliser des titrages d'anticorps selon la classique méthode des échantillonnages. Il suffit d'utiliser le montage que nous décrirons au chapitre VII, c'est-à-dire celui qu'on utilise pour les réactions de fixation du complément en séries continues. Pour l'objet des recherches discutées dans ce chapitre, on dispose dans des godets consécutifs des dilutions du sérum à tester.

A titre d'exemple, nous donnons les résultats donnés par le sérum n° 12 229. On utilise l'antigène cardiolipidique au 1/200,du sérum de cobaye à 2,5 % :

Système immunologique =

- Ag cardiolipidique à 1/200 . . . . . 0,6 ml/mn
- Sérum de cobaye au 1/40 . . . . . 0,8 ml/mn
- Sérum syphilitique 12 229 plus ou moins dilué . . 0,6 ml/mn

puis à 2 ml/mn du mélange précédent, et après incubation à 37° pendant 30 mn on ajoute :

- Suspension d'hématies sensibilisées . . 0,8 ml/mn

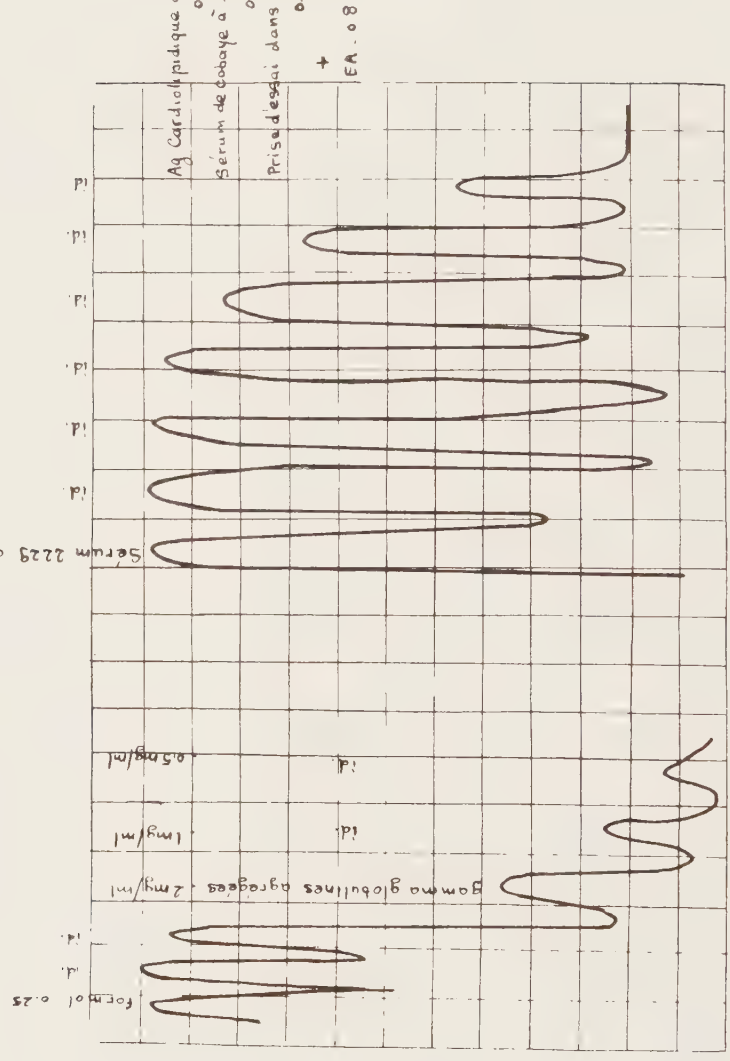


FIG. 11 - TITRAGE DES ANTICORPS PAR UTILISATION DE LA METHODE DE DILUTION EN TUBES

Le sérum est successivement utilisé aux dilutions 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1 280, ces dilutions de raison 1/2, étant effectuées sans changer de pipette, ainsi qu'on le fait en sérologie manuelle.

Le graphique de la figure n° 11 montre les résultats obtenus.

4°) Titrage des anticorps par détermination du coëfficient de vitesse K :

Il est possible d'évaluer l'activité anticorps d'un sérum en mesurant le coefficient de vitesse de fixation K. Pour ce faire, on utilise des montages de l'AutoAnalyseur permettant l'étude de la cinétique de la réaction de fixation du complément, selon la technique décrite par ailleurs (3, 47, 49, 52).

Avec cette technique, il est possible de définir un type de fixation en utilisant seulement le calcul du coefficient de vitesse K.

Nous devons signaler que ce coefficient K dépend en partie de la quantité des anticorps présents dans la prise d'essai. L'exemple suivant illustrera cette méthode :

Systèmes immunologiques	1	2	3	4	5	6
Eau physiologique qsp	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Antigène cardiolipidique	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sérum de cobaye	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sérum syphilitique	0,8	0,4	0,1	0,025	0,01	0,005
Résultats						
Fixation 100 % en	6 mn	8 mn	15 mn	30 mn	90 mn	pas
Angle	80°	80°	70°	55°	10°	de
Valeur de K	0,1	0,1	0,08	0,03	0,005	fixation

On voit donc que la vitesse de fixation est fonction de la quantité de sérum, donc de la quantité de réagines mises en jeu (Fig. 12).

5°) Conclusion :

L'objet de ce chapitre était d'établir comment on pouvait résoudre l'automatisation des titrages d'anticorps. Nous avons montré que les méthodes possibles sont nombreuses. Si on dose des anticorps agissant directement sur les hématies (hémolysines), le montage est simple; il sert non seulement à définir l'unité hémolytique 100 % ou l'unité hémolytique 50 % mais encore à étudier les propriétés du sérum hémolytique en recherchant si le sérum hémolytique obéit à la règle de sensibilisation optimale. Si on dose des anticorps fixant le complément, on peut utiliser au moins trois méthodes distinctes : soit la méthode de dilutions continues, soit celle des dilutions discontinues, soit enfin l'étude de la vitesse de fixation.

Jusqu'à présent, notre travail sur le titrage des anticorps a été d'ordre essentiellement pratique. Par ces méthodes, de nombreux problèmes peuvent être étudiés avec ces techniques, problèmes qui se posent dans les différents domaines d'application des réactions de fixation du complément (syphiligraphie, virologie, bactériologie ...) par exemple : comparaisons des méthodes de titrages, évolution des courbes de titrage en fonction des progrès de la maladie ou de l'instauration d'une thérapeutique...

CHAPITRE VI

REALISATION AUTOMATIQUE DES REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT APPLICATION A DES SERIES DE DETERMINATION

Les recherches théoriques et pratiques que nous avons exposées aux chapitres précédents permettent d'aboutir à la conclusion qu'il est possible d'automatiser la réalisation des réactions de Bordet-Wassermann.

En effet, l'étude de la cinétique des réactions montre qu'à 37° la vitesse de fixation du complément est d'autant plus rapide que le sérum est riche en anticorps. En moins de 15 mn, les sérums riches (positifs +++) fixent totalement l'unité de complément mise en jeu. Les sérums faiblement positifs fixent en 30 mn à 37° une quantité de complément qui est fonction du degré de positivité des sérums.

Par ailleurs, l'équipement AutoAnalyseur convient parfaitement pour évaluer le degré d'hémolyse et donne des mesures quantitatives que ne peuvent donner les seules appréciation visuelles exprimées par 0, +, ++, +++. Rappelons à ce propos, que l'oeil considère comme hémolyse 0 une suspension contenant 50 % d'hématies lysées (technique BW dite Kolmer simplifiée).

L'antigène cardiolipidique et l'antigène tréponémique sont tous deux également utilisable dans les dosages effectués par l'AutoAnalyseur.

Enfin, il est possible de tester l'effet anti-complémentaire des sérums en remplaçant le prélèvement de la dilution antigénique par un prélèvement de tampon physiologique. Nous verrons plus loin que cette possibilité est utilisée pour contrôler les résultats positifs.

Dans ces conditions, il est possible de proposer une automatisation de la réaction de Bordet-Wassermann. Dans le protocole expérimental décrit ci-après, nous avons essayé de rester aussi près que possible des techniques classiques préconisées en France et de reproduire tous les moments de l'opération manuelle. En particulier, nous avons respecté les proportions visuelles entre les divers réactifs mis en présence.

Nous avons aussi voulu que les opérations concernant l'appareillage soient aussi aisées que possible, c'est pourquoi le schéma des tubes et des éléments utilisés est le même que celui que nous avons vu aux chapitres III, IV et V, de façon à ce que l'opérateur puisse effectuer avec le même assemblage les opérations de titrages des réactifs par dilutions exponentielles continues et les opérations de fixation du complément en séries discontinues.

I - DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

On utilise le schéma décrit précédemment (page 37).

Le tube n° 4 prélève la dilution antigénique, préparée en tampon physiologique et dans le rapport prescrit par le fabricant (par exemple dilution au 1/200 pour l'antigène cardiolipidique de l'Institut Pasteur,

dilution au 1/20 pour l'antigène tréponémique de l'Institut Mérieux). Ces dilutions sont préparées par volumes de 50 ml ou de 100 ml suivant le nombre de sérums à étudier.

Le tube n° 2 prélèvera la dilution de sérum de cobaye qui correspond à 2,5 unités C'H 50. On prépare cette dilution par volumes de 100 ml, car en milieu tampon physiologique, l'inactivation spontanée est négligeable si la température extérieure est peu élevée. Il n'est pas interdit, toutefois, de prendre la précaution d'entourer le récipient d'un manchon de glace.

Le tube n° 1 prélève les sérums. Ceux-ci sont décomplémentés classiquement à 56°. Les godets seront disposés sur la couronne du distributeur et on utilisera une came donnant 50 prélèvements par heure et un temps de prélèvement pour quatre temps de rinçage par solution physiologique tamponnée, amenée dans la cupule de rinçage par un tube de débit assez important (de l'ordre de 3 ml/mn).

A la sortie de la pompe, les jonctions se font par des raccords en h. Après segmentation par de l'air, les réactifs vont traverser pendant 30 mn l'enceinte maintenue à 37°. Ils reviendront à la pompe et avant de la traverser, seront "débullés" par un dispositif adéquat. Après réaspiration, l'addition du système hémolytique se fera, puis à nouveau segmentation par des bulles d'air et, hémolyse dans la 2ème enceinte à 37° et passage au photomètre enregistreur.

II - ETUDE DES ENREGISTREMENTS OBTENUS

Les enregistrements présentent une série de pics correspondant aux sérums étudiés.

Les pics peu accentués correspondent aux sérums négatifs et cette légère absorption est due à la présence d'une fraction de sérum dans le liquide présenté au colorimètre. En effet, ces petits pics n'augmentent pas si on ajoute de l'hémoglobine au sérum. Ils ne se manifestent pas pour le liquide céphalorachidien. Ils sont plus ou moins importants et sont proportionnels aux taux de protéines sériques, dépendant cependant aussi de la limpidité des échantillons étudiés.

Les sérums positifs donnent des pics très élevés qui atteignent la ligne de base "hémolyse zéro". Les sérums faiblement positifs (dits à + ou ++) donnent des pics de hauteur intermédiaire (Fig. 13).

On peut tirer de ces enregistrements, des appréciations semi-quantitatives : en effet, entre deux prélèvements sériques, le tube n° 3 aspire du tampon physiologique qui sert de solution de rinçage. Etant donné que ce liquide ne contient pas d'anticorps, le complément est libre et le tracé redescend à la ligne de base inférieure correspondant à l'hémolyse 100 %. Mais ce liquide est prélevé par définition par le

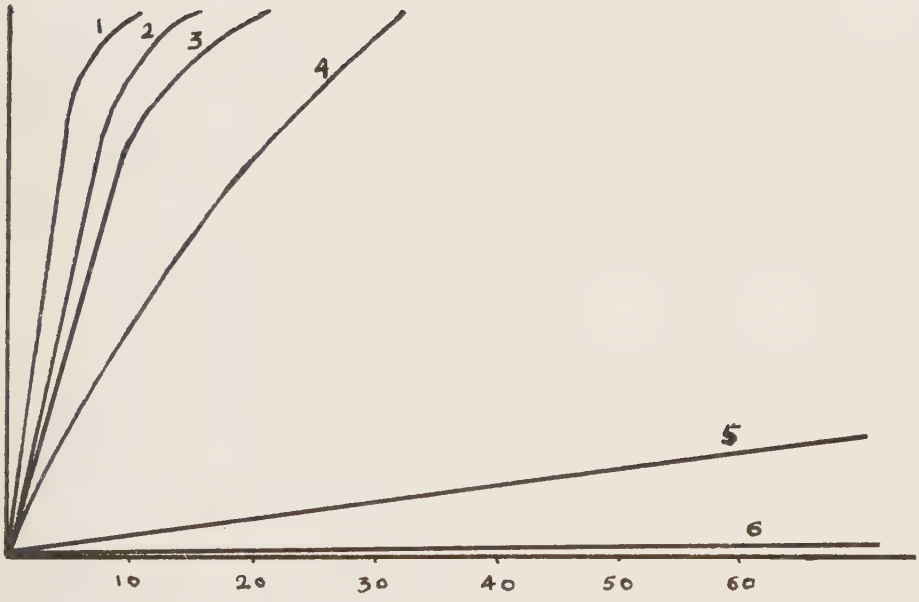


Fig. 12 - Vitesses des réactions.

même tube qui a prélevé les sérums. Or, si l'échantillon qui vient d'être prélevé est riche en anticorps, les parois du tube seront contaminées par l'adsorption du sérum et des anticorps, et les premières fractions du liquide de rinçage vont donc entraîner ces anticorps, de sorte que la positivité de la réaction va se poursuivre plus ou moins longtemps avec la solution de lavage.

Il s'en trouvera que la largeur des pics, traduisant l'effet dans le temps, aura une certaine signification : plus le pic élevé est large, plus grande est la richesse en anticorps du sérum étudié. C'est pourquoi nous proposons une étude planimétrique des pics, * comme approximation de la positivité des sérums, étant entendu que seules les méthodes de dilution continue vont permettre la quantitation par appréciation du point d'hémolyse 50 % (voir chap. V).

III - ADAPTATION DE LA METHODE DES DILUTIONS EXPONENTIELLES CONTINUE A L'ETUDE DE SERIES DE SERUM.

Dans l'éventualité de l'étude d'un certain nombre de sérums correspondant à des atteintes primaires ou secondaires de syphilis et ce, dans des laboratoires travaillant en relation avec des dispensaires antivénériens, nous avons pensé que les phénomènes de contamination seraient trop importants, allant jusqu'à rendre inintelligibles des tracés sur lesquels 2, 3 ou 4 sérums riches en anticorps se suivraient.

C'est pourquoi, nous avons pensé que l'adaptation de la méthode de dilution automatique des sérums serait intéressante car :

1° on obtient directement une titration des taux d'anticorps,

2° le taux d'anticorps est considérablement dilué en fin de prélèvement et par là même n'aura pas d'influence sur l'échantillon suivant, que celui-ci renferme ou ne renferme pas d'anticorps antitréponémiques.

Réalisation pratique :

Une modification très simple du dispositif préleveur sera effectuée : un deuxième cathéther sera monté et fixé parallèlement au premier dans le bec de prélèvement du distributeur. De cette manière, et par ce deuxième tube, on fera affuser la solution de tampon physiologique de dilution directement dans le godet contenant le sérum non dilué. Par le premier bec, passera le cathéther qui sert au prélèvement de l'échantillon dilué.

La rotation de la couronne sera commandée par une came assurant 20 mouvements par heure. Chaque prélèvement-dilution aura lieu pendant 80 secondes et sera suivi d'un rinçage durant 40 secondes (came

* Voir page 80 : planimétrie des résultats positifs.

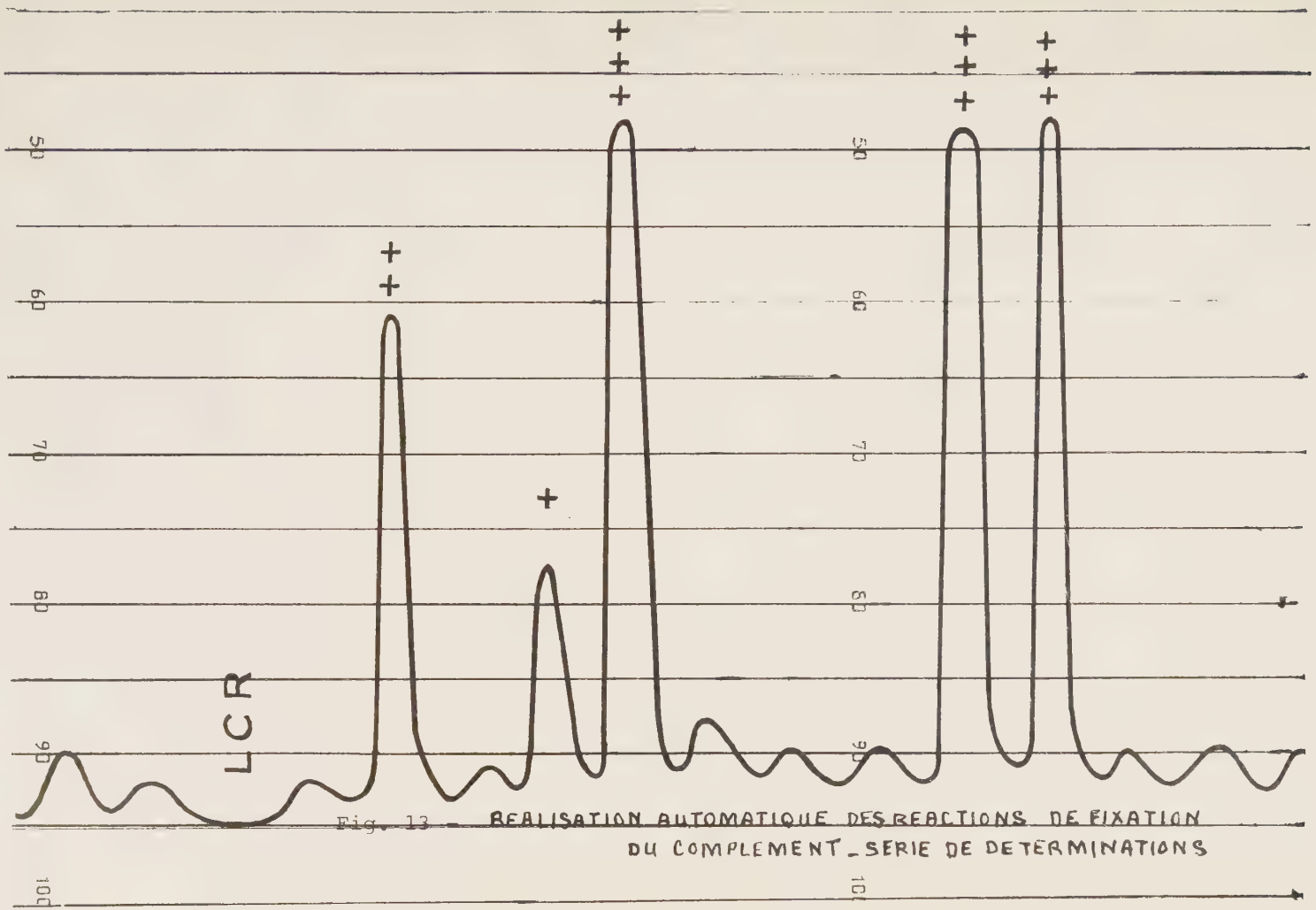
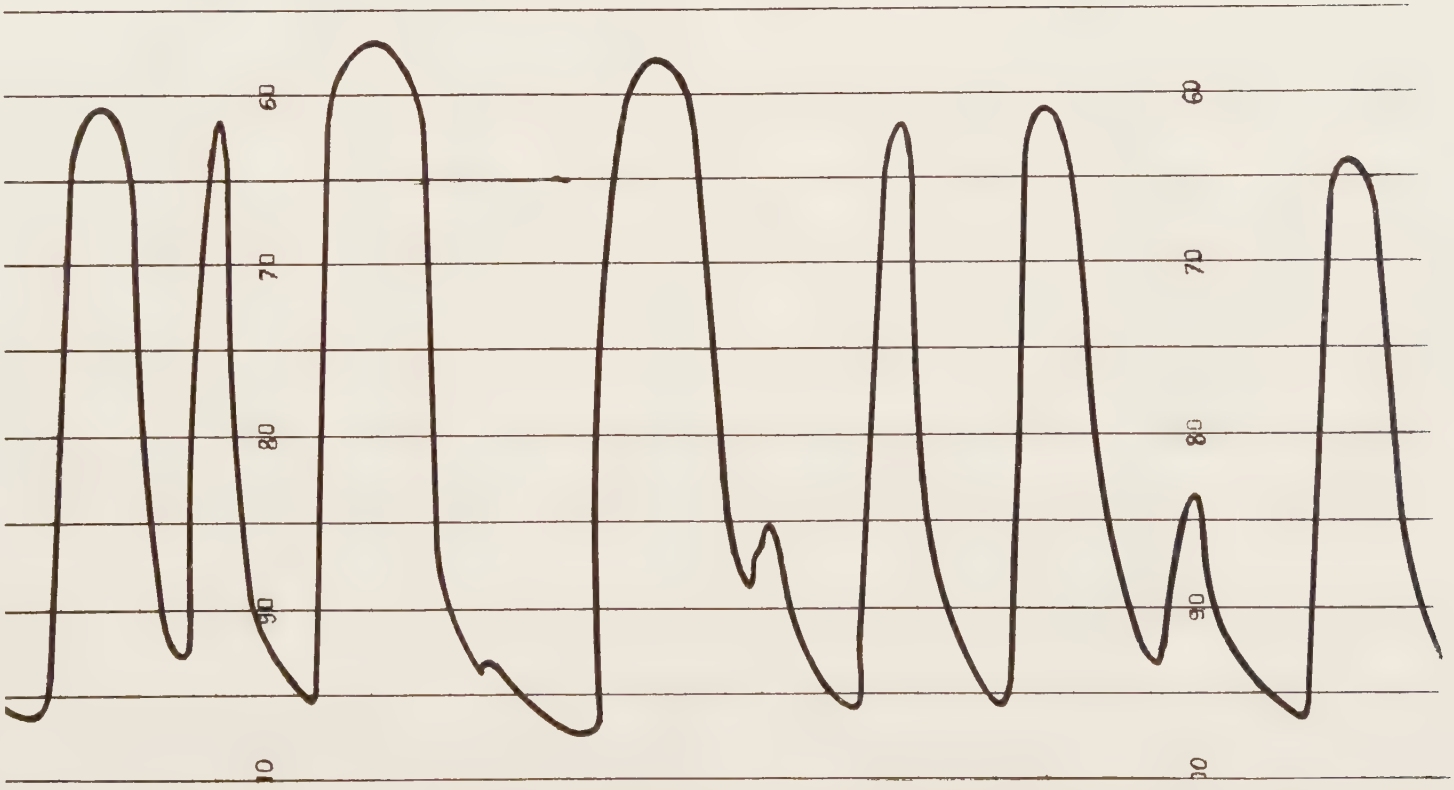


Fig. 13 — REALISATION AUTOMATIQUE DES REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT - SERIE DE DETERMINATIONS

Fig. 14 - ADAPTATION DE LA METHODE DE DILUTION EXPONENTIELLE CONTINUE A L'ETUDE DE SERIE DE SERUM



20 2/1).

De cette manière, on peut examiner 20 sérums positifs par heure en obtenant un titrage exact et précis de la teneur en anticorps, et ce absolument sans intervention de l'opérateur dont le seul rôle sera de préparer les réactifs et de collationner les résultats (Fig. 14).

IV - MISE AU POINT DES DIVERSES CONDITIONS TECHNIQUES

Le protocole expérimental est très souple et il est facile de faire varier un à un les différents facteurs techniques, afin d'en apprécier l'importance et de déduire les conditions optimales pour l'obtention de bons résultats.

1°) Rythme des prélèvements de sérum :

Nous avons testé des cadences de prélèvement comprises entre 20 et 70 prélèvements par heure, en interposant ou non, entre chaque sérum, des godets de rinçage ne contenant que du tampon physiologique. Toutes ces cadences peuvent convenir, cependant, à 70 sérums par heure, le problème des contaminations n'est pas encore résolu. C'est pourquoi nous estimons que dans l'état actuel de la technique un rythme de 50 analyses par heure convient.

2°) Détermination du rapport entre le temps de prélèvement et le temps de rinçage :

Dans les techniques chimiques effectuées avec cet appareil, le rapport prélèvement/rinçage est généralement de l'ordre de 2 pour 1, mais dans ces dosages les valeurs extrêmes possibles entre deux échantillons sont rarement supérieures à 10.

En sérologie, il n'en est pas de même puisque, d'une part certains sérums ne contiennent aucun anticorps et que, d'autre part, des sérums peuvent être positifs avec une dilution du 1/100, alors que d'autres non dilués n'auront qu'un léger degré de positivité.

Il nous a donc semblé qu'il fallait augmenter le temps de rinçage et diminuer le temps de prélèvement. Nous avons essayé des rapports prélèvement/rinçage égaux à 1/2, 1/3, 1/4 et 1/8. Les meilleurs ont été obtenus avec le rapport 1/4.

3°) Détermination du flux liquidien total : (volume débité par minute pour le temps de fixation) :

De nombreux schémas de circuits ont été essayés, les flux allant de 1 ml/mn à 3 ml/mn. La règle suivante se dégage : plus le flux est important, meilleurs sont les lavages entre deux prélèvements consécutifs. Cependant, un flux trop important nécessite l'emploi d'un plus grand nombre de bobines de délai-si on désire maintenir 30 mn de fixa-

tion.

Il apparaît donc qu'un débit voisin de 2 ml/mn doit être choisi.

4°) Quantité de sérum à prélever :

Le flux total étant fixé aux environs de 2 ml/mn, la quantité de sérum doit être voisine de 0,2 ml aspiré par minute.

Ainsi se trouve conservé le rapport 1/10 des techniques manuelles (sérum 0,05 - volume total 0,55). Mais cette quantité de sérum peut être obtenue de différentes méthodes, soit en prélevant du sérum pur (par exemple par un tube de 0,23 ml/mn) soit en prélevant 0,8 ml d'un sérum dilué au 1/4, ou même 1,6 ml d'un sérum dilué au 1/8.

Nous avons trouvé que la dilution préalable des sérums n'améliorait pas sensiblement le rinçage. On doit donc éliminer la préparation manuelle des dilutions sériques préalables.

5°) Détermination des aliquotes de complément et d'antigène :

Le flux total et la quantité de sérum se trouvant fixes expérimentalement, la détermination des deux autres paramètres est simple. Dans les méthodes manuelles, quand le volume de sérum est 1 le volume d'antigène est 2 et celui du complément 8. Nous avons gardé cette proportionnalité et le système immunologique se trouve donc être le suivant :

Sérum	0,23 ml/mn
Antigène	0,42 ml/mn
Complément	1,6 ml/mn

Puisque le sérum est prélevé pendant un temps de 1/250e d'heure, soit 15 secondes, soit 1/4 de minute, on voit que pour chaque test on utilise

$$\frac{0,23}{4} = 0,05 \text{ ml.}$$

Par conséquent la méthode automatique reproduit exactement la méthode manuelle, à la fois dans ses proportions et dans ses quantités.

6°) Détermination des quantités de complexe hémolytique nécessaires :

En suivant les techniques manuelles, on aboutit à la conclusion que pour un volume de fixation de 0,55 le volume de complexe hémolytique est de 0,2 soit un peu supérieur au 1/3 du volume du temps de fixation. C'est pourquoi, puisque nous réaspirons 2 ml/mn, nous avons fixé le débit du complexe hémolytique égal à 0,8 ml/mn.

Il est bien évident que l'appareillage automatique permet plus de liberté dans l'expérimentation que les procédés manuels. En particulier il nous paraît intéressant que l'AutoAnalyseur permette d'éliminer automatiquement une partie du volume du premier temps de la réaction de fixation du complément. Si par exemple le volume prélevé au cours du premier temps est de 2,25 ml, ce volume contient l'équivalent de 2,5 unités C'H 50, c'est-à-dire 1,6 environ C'H 100. On conçoit donc que, comme cela a lieu pour les techniques manuelles, si la fixation est peu importante (0,5 unités C'H 100) il persistera 1,1 unité C'H 100. On obtiendra donc une hémolyse totale, c'est-à-dire une réaction négative.

Mais si, au lieu de prélever tout le flux du premier temps de la réaction, on n'en prélève que la moitié, ce prélèvement ne contiendra plus que 0,8 unités C'H 100 dans le cas de non-fixation et 0,55 unités C'H 100 dans le cas de fixation faible. Dans ces conditions cette faible fixation s'extériorisera facilement sur le diagramme.

Cependant, nous avons jusqu'à présent conservé la méthode classique, c'est pourquoi à 2 ml de flux contenant le complément libre, nous ajoutons 0,8 ml de complexe hémolytique.

V - DETERMINATION DES DUREES DE FIXATION ET D'HEMOLYSE

Il est indiscutable qu'en sérologie de la syphilis, ou en diagnostic virologique, la technique de Kolmer de fixation prolongée à froid augmente la sensibilité des réactions de fixation du complément. Nous avons démontré par ailleurs (52) que la vitesse de fixation doublait quand la température croît de 10°.

On peut donc établir la correspondance suivante :

16 heures à 7° = 8 heures à 17° = 4 heures à 27° = 2 heures à 37°.

On voit donc que la plus grande sensibilité de la réaction à froid peut s'expliquer en grande partie par sa très longue durée. Nous ne pouvions réaliser une durée de fixation aussi longue. C'est pourquoi, bien que connaissant les insuffisances de la fixation rapide à chaud, nous avons adopté un temps de fixation de 30 mn pour une température de 37°. On pourrait facilement augmenter la température de fixation, mais il n'est pas classique d'utiliser des températures supérieures à 37°.

Quoiqu'il en soit, nous pensons que le temps et la température de fixation dans une réaction de fixation du complément n'ont d'importance que dans la mesure où l'on se trouve dans l'obligation d'utiliser plus de 1 unité C'H 100.

L'AutoAnalyseur peut permettre de modifier considérablement les techniques ordinaires des réactions de fixation du complément, en

travaillant avec une faible quantité de complément. Mais on abandonne ainsi les techniques classiques et dans ce travail nous avons voulu nous limiter à la seule automatisation des procédés déjà existants.

En ce qui concerne la durée du temps d'hémolyse, nous l'avons fixé à 10 mn pour des commodités instrumentales. Cette durée n'a pas l'importance de la durée du temps de fixation. Il suffit en effet qu'elle soit constante, condition réalisée par l'emploi de l'appareillage automatique.

VI - REALISATION D'UNE SERIE D'ETUDE DE SERUMS - APPLICATION A LA SEROLOGIE SYPHILITIQUE.

1°) Titrage du complément :

On réalise la titration du complément par dilution d'un sérum de cobaye frais ou lyophilisé à la concentration initiale généralement voisine de 2 %.

Détermination du C'H 50 (voir Chapitre III).

On multiplie ce titre par 2,5 et on prépare une quantité suffisante.

2°) Fixation en série :

Deconnecter les tubes nécessaires à la dilution.

On va prélever - complément au titre choisi,
- antigène au titre indiqué par le fabricant et on laisse le tube à prélèvement aspirer le tampon physiologique.

On note le temps : au bout de 7 mn, on déclenche la mise en oeuvre du dispositif échantillonneur. Au bout de 20 mn, on commence l'aspiration des hématies sensibilisées, alors que jusqu'ici, les tubes destinés à leur pompage étaient connectés à un récipient contenant du tampon physiologique.

Dans ces conditions on obtiendra d'abord une ligne de base élevée correspondant aux hématies non lysées, puis une hémolyse totale, puis au bout de 40 mn environ, l'apparition du premier pic indiquera que le premier échantillon a été examiné.

On opérera, par exemple, un premier passage des échantillons avec l'antigène tréponémique, puis un second passage avec l'antigène cardiolopidique.

Il sera bon de collecter les sérums ayant donné un pic positif afin de les soumettre à un essai en remplaçant l'antigène par du tampon physiologique de manière à vérifier l'absence d'effet anti-complémentaire.

Rinçage :

Lorsque le dernier échantillon a été prélevé, on pourra connecter les tubes correspondant au premier stade (Fixation) à un récipient contenant de l'eau distillée pour rincer l'appareil. Puis après 35 mn seulement, le tube destiné à pomper les hématies.

Remarque :

Il peut arriver qu'un sérum riche en anticorps contamine le sérum le suivant immédiatement dans le circuit analytique. Il faut, dans ce cas, procéder à un réexamen de ce dernier, en le disposant sur la couronne distributrice après un sérum négatif.

Note :

On peut utiliser comme "marqueur" une solution d'Aldéhyde Formique à 0,50 %. Ce marqueur sera disposé au début de la série d'échantillons et indiquera, par son effet anti-complémentaire, l'arrivée du flux correspondant à la mise en service du dispositif échantillonneur.

Il servira aussi à apprécier la sensibilité du système mis en oeuvre.

CHAPITRE VII

APPLICATIONS DE L'AUTOMATISATION DES REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Dans cette partie de notre travail, nous rapporterons les observations recueillies au Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Tours au cours des derniers mois de 1964. En effet, une fois établis les principes d'automatisation décrits dans les précédents chapitres, il a été possible de réaliser des réactions de fixation du complément en série en utilisant l'AutoAnalyseur. Le travail le plus important a été fait en vue du diagnostic sérologique de la syphilis (réaction de Bordet-Wassermann). Des travaux ont été également entrepris pour le dépistage de la brucellose chez les animaux et la recherche d'anticorps anti-typhoïdiques fixant le complément.

I - REACTIONS DE BORDET-WASSERMANN

1°) Sérums étudiés :

Un total de 878 sérums a été étudié au cours de 21 expériences de réactions de fixation du complément en série continue. Le nombre des sérums étudiés par séance a été compris entre 23 et 80 sérums. Pour ces sérums, la réaction de B-W a été faite en présence de l'antigène cardiolipidique (dilution au 1/200) et de l'antigène de Reiter (dilution au 1/20). La recherche des effets anti-complémentaires a été effectuée systématiquement pour tous les sérums ayant donné des réactions positives.

La provenance de ces 878 sérums s'établit comme suit :

- 206 sérums provenant du Laboratoire Central de sérologie de l'Hôpital Saint-Louis (Pr Dausset, Dr Ripault, Dr Gaillon).

- 25 sérums provenant de l'Hôpital Mustapha d'Alger (Dr Allinne).

- 647 sérums provenant de l'Hôpital de Tours (Centre de Transfusion et services hospitaliers).

Dans ces différents centres, les sérums avaient été testés par les réactions de B-W faites selon les techniques manuelles ordinaires avec les deux types d'antigènes. En outre, les tests suivants étaient pratiqués à l'Hôpital Saint-Louis : test d'immobilisation des tréponèmes de Nelson, test d'immuno-fluorescence ainsi que la réaction de floculation de Kline. Le test de Nelson a été également fait sur les sérums reçus d'Alger (réactions effectuées à Alger même par Mlle Allinne).

Signalons enfin que plus de 80 % des sérums provenant de l'Hôpital de Tours étaient des sérums de donneurs de sang.

2°) Exposés des résultats :

Les résultats globaux sont rapportés dans le tableau suivant :

	0	±	+	++	+++	Anti complémentaire	Total
Saint-Louis							
A	94	8	14	18	65	7	206
B	99	4	7	21	60	15	206
C	87	2	5	13	56	5	168
Alger							
A	0	0	1	4	20	0	25
B	0	0	0	5	20	0	25
C	0	0	0	4	20	0	24
Tours							
A	618	-	17	3	9	0	647
B	622	-	10	6	9	0	647
C	615	-	10	3	9	-	637

Ces résultats concernent la réaction de B-W faite avec l'antigène cardiolopidique. Les lignes horizontales A indiquent les résultats des méthodes manuelles, les lignes B donnent les résultats de la méthode automatisée, les lignes C indiquent le nombre de sérums qui ont donné les mêmes résultats avec l'une et l'autre méthode (concordance).

Avec l'antigène tréponémique de Reiter, les résultats s'établissent ainsi :

	Degré de positivité					Anti-complémentaire	Total
	0	±	+	++	+++		
Saint-Louis							
A	106	7	12	15	59	1	206
B	104	2	14	19	56	15	206
C	99	1	9	12	50	5	176
Alger							
A	0	0	2	6	17	0	25
B	0	0	2	5	18	0	25
C	-	-	2	5	17	-	24
Tours							
A	622	-	13	3	9	0	647
B	623	-	10	5	9	0	647
C	621	-	10	3	9	-	643

3°) Commentaires :

La discussion doit porter principalement sur les résultats donnés par les sérums provenant de l'Hôpital Saint-Louis. En effet, le fort degré de positivité des sérums d'Alger exclut toute "finesse" de manipulation; il est donc normal que la concordance soit excellente. De même pour les sérums provenant de l'Hôpital de Tours : le très grand nombre de sérums négatifs se retrouve avec une concordance parfaite quelle que soit la méthode utilisée, manuelle ou automatique.

La concordance est moins bonne avec les sérums qui proviennent du Laboratoire Central de Sérologie de Paris.

Une partie de ces discordances doit être attribuée au fait que les sérums ont été conservés pendant un temps assez long : prélevés dans la région parisienne, ils sont acheminés sur le laboratoire de Saint-Louis. Les sérums sont alors testés avec les réactions d'hémolyse et de floculation, stockés, puis soumis au test de Nelson puis à l'immuno-fluorescence, et enfin expédiés à Tours. Cela explique la plus grande fréquence des sérums anti-complémentaires puisque plusieurs semaines se sont écoulées entre les diverses analyses.

Cependant, le nombre des résultats positifs est plus élevé dans la statistique de Saint-Louis. Il faut remarquer que les analyses faites à Saint-Louis sont réalisées avec une technique éprouvée par les années de pratique alors que la méthode automatique a été utilisée au cours même de sa mise au point technique; il s'ensuit des fautes techniques, et dans certaines séries, l'utilisation de léger excès de complément ce qui négative des sérums faiblement positifs. D'autre part, le Laboratoire de Saint-Louis respecte les règles de la sérologie syphilitique: un sérum douteux, suspect ou négatif ayant donné un test de Nelson positif ou une réaction d'immuno-fluorescence positive est revu une deuxième fois au B-W afin de s'assurer du premier résultat, qui dans certains cas doit être revu et corrigé. Cette pratique n'a pas été mise en oeuvre dans les recherches d'automatisation.

Il faut encore souligner une différence fondamentale entre les techniques manuelles et les techniques automatiques : au laboratoire de Saint-Louis, c'est le B-W Kolmer qui est effectué, avec fixation prolongée à froid. Or l'AutoAnalyseur fait des réactions de fixation du complément avec fixation de 30 minutes à 37°. Il est incontestable que dans l'état actuel de la sérologie, une réaction de fixation de complément type Kolmer est plus sensible que tout autre type de réaction de fixation du complément. Nous avons insisté sur ce point dans le chapitre précédent.

Il existe encore un autre point technique qui diffère entre les techniques manuelles et la technique automatique utilisée. Les dilutions des sérums à tester ne sont pas exactement identiques. Certes la proportionalité entre les prises d'essai a été respectée au maximum : pendant une prise de sérum avec le distributeur d'échantillon (Sampler II) qui dure 15 secondes, les quantités de réactifs prélevés sont celles qui correspondent à un tube "réaction" :

Sérum inactivé . . . . . 0,23 ml divisé par 4 = 0,05 ml

Antigène au 1/200 . . . . 0,42 ml " " " = 0,10 ml

Complément . . . . . 1,6 ml " " " = 0,4 ml

Par conséquent il semble que dans les deux types de technique, manuelle ou automatique, le sérum se trouve finalement dilué au 1/11 au cours du temps de fixation. En fait, dans la technique automatique, une partie du sérum reste adsorbé par les parois des tubes de prélèvements (ce qui entraînera les contaminations), et c'est moins de 0,05 ml de sérum qui se trouve mélangé à l'antigène et au complément. Dans la technique automatique proposée, le sérum est en réalité plus dilué que dans la technique manuelle, la dilution réellement obtenue doit se situer entre les valeurs de 1/15 ou même de 1/20. C'est là une raison supplémentaire pour une sensibilité moindre dans les cas des sérums faiblement positifs.

Telles sont les principales causes de discordance entre les deux techniques : fixation à 37° pendant 30 minutes, et dilution réelle plus grande, entre les techniques manuelles et automatiques.

En utilisant les quelques indications fournies lors de l'envoi des sérums, on peut dire que dans les cas de discordance (sérum positif avec la méthode manuelle et négatif à l'AutoAnalyseur ou inversement) une fois sur deux, c'est l'inverse qui semble cadrer le mieux avec le contexte clinique et biologique.

4°) Réactions de B-W avec les L C R :

Signalons que dans les séries automatiques, en plus des 878 sérums 34 échantillons de L C R se sont trouvés testés. Sur ce nombre, deux liquides ont donné des résultats positifs avec l'une et l'autre technique. Par conséquent, il est possible d'appliquer l'automatisation à l'analyse des L C R. Ces L C R ont été étudiés dans des séries utilisant des sérums dilués au 1/4 (tube de pompe = 0,8 ml/mn), la prise d'essai des L C R se faisait sur des échantillons non dilués.

5°) Planimétrie des résultats positifs :

En technique manuelle, le degré de positivité est indiqué par l'intensité de l'inhibition de l'hémolyse. Dans le système de notation utilisé en France, on évalue l'hémolyse par les notations +++, ++, +, ± et 0. L'appréciation du degré étant laissé au manipulateur. La notation américaine présente l'avantage de reposer sur un standard précis :

Hémolyse % réel	0 %	50 %	75 %	87 %	95 %	100 %
Appréciation	0	±	+	++	+++	++++
Degré de fixation	++++	+++	++	+	±	0

Ces chiffres traduisent la grande imprécision des lectures faites à l'oeil nu pour apprécier une lyse comprise entre 0 % et 50 %. La lecture néphélométrique donnée par le photomètre est sensible et suit, nous l'avons vu, la loi de proportionalité de Beer Lambert. La hauteur du pic traduit exactement le degré d'inhibition de la lyse des globules.

Les indications quantitatives fournies par l'AutoAnalyseur sont encore plus précises. Dans les techniques manuelles, dites "à un tube", on ne peut distinguer entre un sérum positif +++ à une unité et un sérum positif +++ à 16 unités. Ces deux sérums donnent en effet une inhibition totale de la lyse. Il est nécessaire de faire une réaction quantitative par dilutions successives pour apprécier la différence existant entre les deux sérums. Avec l'AutoAnalyseur, le pic donné par chacun de ces deux sérums diffère, non en hauteur (la ligne de base "hémolyse zéro" est atteinte dans les deux cas), mais en largeur. Les liquides de

qui séparent deux prises d'échantillons se trouvent toujours contaminés par les dépôts de sérums sur les parois. Dans le cas d'un sérum positif +++ à une unité, les liquides de lavage s'appauvrissent très vite en réagine, et l'inhibition de la lyse cesse rapidement. Au contraire, si le sérum est positif à 16 unités, les liquides de lavage contiennent encore assez de réagine pour fixer le complément, le temps de positivité du sérum se prolonge, le pic est plus large et arrive à couvrir le prélèvement qui suit.

Par conséquent, il y a possibilité de quantifier la réponse en tenant compte à la fois de la hauteur et de la largeur du pic positif. La meilleure façon d'apprécier les deux paramètres simultanément consiste à planimétrer les résultats.

Des comparaisons ont été faites à Tours entre les dosages par planimétrie et les dosages par dilution. Sur 22 sérums positifs +++ (entre 1 et 32 unités) une très bonne corrélation a été trouvée entre les deux techniques.

6°) Conclusion :

Bien que le nombre de sérums étudiés soit peut important (878), la concordance entre la méthode automatique et la méthode manuelle apparaît être du même ordre que celle qu'on pourrait relever entre deux laboratoires différents, étudiant les mêmes sérums avec des techniques manuelles voisines. Il y a concordance absolue pour les sérums franchement positifs (plus de 2 unités). Il y a une assez bonne concordance pour les autres sérums, avec un taux de discordance de 15 % environ, dans les séries de sérums fournies par l'Hôpital Saint-Louis, la moitié de ces discordances se trouvant en faveur des techniques manuelles, alors que l'autre moitié des discordances se situe en faveur des résultats de la technique automatique. La discordance n'est donc pas apportée par l'automatisation. Elle tient à la nature même de la technique actuelle de la réaction de B-W.

II - REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT EN SERIE, AVEC D'AUTRES SYSTEMES IMMUNOLOGIQUES.

Les réactions de fixation du complément en série, réalisées automatiquement avec l'AutoAnalyseur, ne se limitent pas au seul domaine du séro-diagnostic de la syphilis. Tout diagnostic sérologique basé sur le principe de la fixation du complément peut être automatisé. Cette généralisation de l'automatisation est facilitée par le fait que la plupart des réactions de fixation du complément conventionnelles reposent sur le même standard expérimental : par exemple, avec les divers antigènes fournis par l'Institut Pasteur, il existe la même proportionnalité entre la prise d'essai de la dilution sérique, le volume de la solution antigénique et la quantité de complément.

A titre d'essai, nous avons pratiqué des réactions de fixation du complément en séries pour le séro-diagnostic de la brucellose animale et pour la recherche des anticorps anti-typhoïdiques.

1°) Automatisation de la réaction de fixation du complément dans la brucellose :

Des sérums d'animaux nous ont été fournis par le Docteur Rivet (Laboratoire Départemental d'Angers) et par le Docteur Gaumont (Ecole d'Alfort). L'antigène utilisé est celui de Montpellier dilué au 1/10, c'est-à-dire 10 fois moins concentré que dans les réactions de séro-agglutination. Des sérums de bovins sont dilués au 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32 avant d'être placés dans les godets du distributeur d'échantillons; ils se trouveront donc en fait dilués au 1/40, 1/80 ... au cours du temps de fixation.

Les résultats obtenus sont conformes à ceux que les techniques manuelles de contrôle ont donnés, ils correspondent aussi aux observations faites lors des études sur la cinétique de la fixation du complément par les immuno-complexes brucelliques.

Il faut cependant faire une remarque technique : quand on utilise des sérums dilués, on supprime le léger pic donné par les sérums concentrés, pic qui correspond à l'absorption lumineuse due aux protéïnes sériques. Il sera donc nécessaire, quand on réalisera en pratique l'automatisation des RFC avec prises d'essai diluées, de prévoir un système de marquage indiquant le passage des échantillons.

2°) Dosage des anticorps anti-typhoïdiques fixant le complément :

Il s'agit dans ce cas d'expériences qui ne visent pas un but pratique mais qui servent à définir les possibilités des techniques automatiques. Les sérums sont des sérums de lapin immunisés par injections de Salmonella typhi. L'antigène utilisé est une suspension très diluée d'une culture de bacilles d'Eberth (10^8 bactéries par ml environ). Avec un tel immuno-complexe on obtient des graphiques sur lesquels les pics sont d'autant plus larges que la richesse en anticorps est forte dans la prise d'essai.

III - CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons voulu montrer que les recherches sur l'automatisation des RFC ont dépassé le stade de l'étude théorique. Nous montrons que, dans l'état actuel des recherches, l'automatisation se réalise assez aisément et qu'un laboratoire non spécialisé peut obtenir des résultats qui supportent la comparaison avec ceux obtenus par les méthodes manuelles dans des laboratoires spécialisés.

Limité à cet aspect du problème immunologique, on peut dire que l'automatisation n'offre, en sérologie, que les avantages connus des

chimistes : plus grande sûreté dans les résultats puisque toute faute se répète et est par ce fait plus facilement reconnue, plus grande reproductibilité, diminution de la main d'oeuvre, enfin plus grande rapidité, la méthode automatique pouvant remplacer souvent les longs dosages quantitatifs.

L'avenir doit dependant tendre à dépasser le simple stade de l'automatisation. En fait, les RFC de routine reposent sur un empirisme commode mais irritant : le sérologiste est contraint à utiliser 2 unités de complément alors qu'il sait ne pouvoir titrer qu'une seule unité. C'est dire que toute fixation faible, laissant encore une unité libre, se traduit comme une absence de fixation. Cette nécessité d'un excès de complément est due à la labilité du complément d'une part, et d'autre part au fait que le sérum inactivé dans lequel on veut mettre en évidence les anticorps a une action mal connue, sur la lyse des hématies. Nous pensons qu'en raison de son principe, l'AutoAnalyseur peut faciliter l'analyse théorique des divers facteurs des RFC comme il a permis l'analyse de la cinétique de la fixation du complément sur les systèmes immunologiques spécifiques. Cette étude théorique doit tendre à diminuer la marge qui existe entre la quantité de complément utilisée et les possibilités de dosage. L'objectif qui semble pouvoir être atteint, serait de faire des RFC avec moins de 1 unité C'H 100, ainsi toute fixation, si minime soit-elle, pourrait être étudiée. On obtiendrait ainsi un maximum de sensibilité dans des conditions expérimentales reproductibles.

L'état actuel de notre travail autorise à s'engager dans cette voie non classique. Il convenait cependant de s'assurer auparavant de la valeur de l'automatisation en sérologie traditionnelle, valeur que nous avons étudiée dans ce chapitre.

CHAPITRE VIII

AUTOMATISATION DE LA MISE EN EVIDENCE DES EFFETS ANTI-COMPLEMENTAIRES

Les études cinétiques de fixation du complément à l'aide de l'Auto-Analyseur ont amené Vargues et collaborateurs à préciser les modalités d'inactivation du complément par effet anti-complémentaire non spécifique (50, 51).

Il semble que l'analyse cinétique permette de distinguer au moins trois types d'effets anti-complémentaires.

1er type gamma-globulines agrégées (50)

Dans ce type l'inactivation non spécifique ressemble en tous points à une fixation du complément sur un immuno-complexe : les quantités actives sont de l'ordre du microgramme. L'inactivation est thermodépendante obéissant à la loi d'Antrénius-Van t'Hoff.

2ème type

Ce type est représenté par l'effet anti-complémentaire des températures voisines du 56°. La cinétique de cette inactivation a été étudiée par Bigger (4) en 1918, et obéit à une cinétique d'ordre 2.

Certaines substances chimiques telles que les peptones peuvent donner ce type d'effet anti-complémentaire.

3ème type

Enfin, des sérums vieillis, le sérum de lapin en particulier, ont la propriété d'inhiber instantanément une quantité définie de complément. En employant des quantités; tératives de tels sérums, on obtient une courbe cinétique d'inactivation par paliers.

Ces recherches, encore en cours au Laboratoire de Bactériologie de Tours, montrent l'intérêt de l'emploi de l'équipement automatique dans l'étude de cette importante question de l'étude des effets anti-complémentaires.

Mais ce n'est pas cet aspect théorique que nous avons étudié dans notre thèse. Nous allons exposer comment le circuit utilisé dans les réactions de fixation du complément peut servir à évaluer les effets anti-complémentaires des sérums, des antigènes ou d'autres substances pouvant interférer avec le complément.

I - ETUDE SUR LES EFFETS ANTI-COMPLEMENTAIRES DES SOLUTIONS DILUEES D'ALDEHYDE FORMIQUE

Nous avons proposé dans le chapitre précédent de "marquer" le début d'une série continue de 40 sérums à l'aide de trois godets d'Aldéhyde Formique à 0,5 %. En effet, le formol a un effet anti-complémentaire, effet proportionnel à la quantité utilisée.

Selon nous, cet effet doit être attribué à la formation de gamma globulines agrégées, sous l'action polymérisante du formol. A pH 7,4 ce phénomène affecte principalement les gamma globulines. Quoiqu'il en soit, le montage proposé au chapitre VI permet de titrer cet effet anti-complémentaire du formol, ou inversement de déterminer la sensibilité du titrage de l'inactivation du complément : dans les conditions techniques proposées, le passage d'un godet contenant 0,5 % de formol doit provoquer sur le papier de l'enregistreur, la formation d'un pic aigü atteignant cependant la ligne de base hémolyse 0.

Tout excès de complément qui diminue la sensibilité des réactions de fixation se traduit par une moindre hauteur des pics formol. Cette étude des "pics formols" est donc techniquement utile.

II - MISE EN EVIDENCE DES SERUMS ANTI-COMPLEMENTAIRES

Toute réaction de fixation du complément doit comporter le "tube" témoin sérum. Ces témoins sérum sont très facilement obtenus par la méthode automatique. Il suffit en effet de remplacer le réservoir antigène par un réservoir de tampon physiologique.

Pour la commodité et la rapidité des réactions automatiques il ne nous semble pas nécessaire de pratiquer ce contrôle avec les sérums dits à "réaction négative". On se contentera de repasser dans le circuit analytique les sérums à "réaction positive".

Dans le cas de sérums anti-complémentaires, il sera possible de déterminer si ces sérums contiennent ou non des anticorps spécifiques, en traitant ces sérums selon les techniques manuelles classiques. Mais il sera plus intéressant de préciser le type anti-complémentaire selon les principes définis plus haut.

III - EFFET ANTI-HEMOLYTIQUE DES FORTES CONCENTRATIONS SERIQUES

Les sérums humains peuvent gêner la lyse par le complément des globules rouges sensibilisés, non seulement en inactivant le complément de façon non spécifique (effet anti-complémentaire) mais encore en empêchant la destruction des complexes $E^{\ddagger}$ (= $EAC'_{1,4,2,3}$) (7, 16). En effet, la phase ultime de l'hémolyse est de nature physique. L'hématie, dont la surface a été lysée par la réaction immunologique, libère son hémoglobine dans le liquide ambiant. Des substances macromoléculaires, telles que la Polyvinylpyrolidone (48) peuvent s'opposer au déroulement de ce phénomène physique. Les molécules protéiniques apportées par le sérum, possèdent également ce rôle protecteur anti-hémolytique.

Cette action anti-hémolytique des fortes concentrations sériques est facilement démontrée avec l'AutoAnalyseur : il suffit d'utiliser une do-

se de complément inférieure à l'unité C'H 100. Dans ces conditions, en l'absence de prise de sérum, la ligne de base hémolyse maximale se situe entre une densité optique de 0,05 à 0,15.

Cette ligne de base demeure stable tant qu'aucun sérum n'est prélevé. Quand les sérums sont prélevés et qu'ils se trouvent en présence des hématies à hémolyser (concentration sérique = 1/15) l'hémolyse est fortement diminuée. Cet effet anti-hémolytique des sérums, disparait dès que la concentration sérique est inférieure au 1/30.

Cet effet anti-hémolytique peut donc être distingué de l'effet anti-complémentaire. Il interfère avec les autres facteurs de la réaction de fixation du complément, aussi bien dans les réactions manuelles que dans les réactions automatiques. Ce qui oblige à travailler avec un excès de complément (2 unités C'H 100 dans les réactions manuelles ou 1,6 unités C'H 100 dans les réactions automatiques).

CONCLUSIONS

Le but fixé au début de notre recherche, c'est-à-dire l'automatisation des réactions de fixation du complément, a été atteint.

1°) Nous avons précisé dans quelles conditions la méthode d'automation introduite par Skeggs peut s'appliquer à l'analyse sérologique.

2°) Des études préalables nous ont montré que l'appareillage se révélait adéquat pour l'étude des réactions sérologiques basées sur l'hémolyse. D'autre part, la pompe proportionnante de l'AutoAnalyseur permet la réalisation des dilutions automatiques. Nous avons précisé la formule mathématique d'un système de dilution exponentielle continue facilement utilisable dans les dosages nécessaires en sérologie.

3°) L'obtention de courbes de dosages du complément permet une définition exacte de la concentration déterminant une hémolyse de 50 % (unité C'H 50). La parfaite reproductibilité de ces dosages du complément a deux conséquences :

- une première conséquence, d'ordre pratique : nous fixons à 2,5 unités C'H 50 la concentration de complément utilisable dans l'automatisation des réactions de fixation du complément classiques.

- une deuxième conséquence théorique : les courbes de titrage du complément contredisent l'équation de Von Krogh ; ces courbes de titrage sont plus facilement interprétées en tenant compte de l'hétérogénéité des populations globulaires au phénomène de lyse.

4°) Les mêmes principes de dilution automatique ont été appliqués aux dosages des antigènes (cardiolipidiques, tréponémiques, brucelliques, aphteux, rickettsiens). Les courbes permettent une évaluation très précise des points d'activité 50 % et une appréciation satisfaisante des points d'activité 100 %. Ces dosages précis d'antigènes ont une grande importance dans le titrage des préparations antigèniques ou des fabrications vaccinales.

5°) Des principes identiques s'appliquent au titrage des anticorps dans les immuns sérums. Ils permettent également un dosage précis des hémolysines.

6°) Les différents facteurs de la réaction de fixation du complément ayant été étudiés et titrés de façon automatique, la réalisation de ces réactions, automatique et en série, n'a posé que peu de problèmes. Dans ce travail, nous nous sommes attachés uniquement à reproduire automatiquement les réactions pratiquées classiquement manuellement. Les résultats donnés par l'enregistreur sont aisément analysables.

7°) La technique automatique a été appliquée à l'étude de la réaction de Bordet-Wassermann (antigène cardiolipidique et antigène tréponémique). 878 sérums ont été testés en routine automatique. Sur ce nombre 151 sérums provenaient de sujets syphilitiques. La concordan-

ce avec les réactions manuelles a été parfaite pour plus de 90 % des cas. Dans 7,5 % des cas, la réaction automatique (positive) cadrait mieux avec la clinique que la réaction manuelle (négative). Dans les autres cas, l'inverse s'est produit.

8°) Enfin, la méthode automatique s'applique également à la mise en évidence des effets anti-complémentaires.

En conclusion, nous montrons que tous les gestes nécessaires dans l'exécution des réactions de fixation du complément peuvent être automatisés.

Il reste à utiliser au maximum les avantages de reproductibilité apportés par l'automation, ce qui permettra dans un avenir proche de donner aux réactions de fixation du complément un maximum de sensibilité.

ANNEXE I

REMARQUES CONCERNANT LA REALISATION DES RFC EN SERIES CONTINUES

REACTION DE BORDET-WASSERMANN POUR LE DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

Les techniques proposées conviennent parfaitement à la réalisation des B-W. Il existe cependant un inconvénient : il y a contamination des sérums négatifs par les sérums positifs ; cela veut dire que la positivité d'un sérum fortement positif se prolonge lors du passage des liquides de lavage et lors du passage du sérum suivant. Très souvent, cette contamination n'est pas gênante, il est très aisé de voir si le sérum qui suit un positif fort est positif ou négatif. Mais parfois, principalement quand les sérums qui se succèdent sont positifs à des degrés divers, il est difficile de repérer les divers sérums.

Pour préciser les données, voyons deux types d'analyse syphiligraphique.

1er cas : Le matériel à analyser est constitué par des sérums provenant de Centres de Transfusion, provenant de demandes d'examens prénuptiaux, ou provenant d'une demande d'analyse de routine pour un service hospitalier de médecine générale. Dans ces cas, le problème posé au laboratoire est le suivant : sur 1000 sérums qui proviennent de sujets non cliniquement suspects de syphilis, rechercher les quelques sérums à sérologie positive. Il s'agit donc d'une recherche de dépistage, d'un examen de présomption. L'AutoAnalyseur donne des résultats irréprochables : sur la sinusoïde de faible amplitude longeant l'ordonnée de D.O. = 0,05 (= suites des sérums négatifs), se détache le pic élevé des sérums positifs à +++ ou moins élevé des sérums positifs à + ou ++. Le rythme des analyses peut être de 50 ou de 60 par heure. Si le pic +++ vient d'un sérum fortement positif, il se peut que le sérum suivant soit "fondu" dans le pic positif. Il faudra donc refaire le sérum dans la prochaine série.

2ème cas : Le matériel à analyser provient d'un dispensaire de vénérologie ou d'un service de dermatologie. Dans ce cas, étant donné la sélection des malades, les sérums positifs sont très nombreux. Il faut donc utiliser directement la technique quantitative avec dilution automatique des prélèvements. Le rythme sera de 20 sérums à l'heure, avec 90 secondes pour le prélèvement-dilution et 30 secondes pour le lavage (came 20 3/1). Le facteur de dilution (exposant x/V) sera égal à 2,3 de façon à obtenir en 90 secondes une dilution égale à 1/40 de la dilution initiale. Avec cette technique, les résultats sont directement quantitatifs, il n'y a pas de contamination d'un sérum à l'autre puisque chaque sérum est dilué suffisamment pour perdre sa positivité complètement ou tout au moins dans une forte proportion.

ANNEXE II

REACTIFS

I - TAMPON PHYSIOLOGIQUE DE MAYER ET LEVINE

C'est une eau physiologique tamponnée à pH 7,4 par apport de barbiturate, et enrichie en ions Calcium et Magnésium.

1°) Préparation du tampon physiologique concentré :

Chlorure de Sodium.	85	g
Di-ethyl-barbiturate de sodium	3,75	g
Acide di-ethyl-barbiturique	5,75	g
Chlorure de magnésium hydraté (6 H20)	1	g
Chlorure de calcium hydraté (2 H20). .	0,2	g

Pour préparer ce tampon concentré, on dissout 85 g de CLNa et 3,75 g de carbiturate de Na dans 1 400 ml d'eau distillée. On dissout à chaud 5,75 g d'acide barbiturique dans 500 ml d'eau distillée. On mélange les deux solutions et on laisse refroidir. On ajoute 5 ml d'une solution stock de C12 % g (1,0 M) et C 12 Ca (0,3 M).

Chlorure de magnésium à 6 H20	203.	g)	$H^2$0-1 000
Chlorure de calcium à 2 H20	44	g)	

On complète exactement à 2 000 ml avec de l'eau distillée.

Cette solution tampon concentrée est conservée à la glacière.

2°) Préparation du tampon physiologique isotonique :

Tampon concentré	100	ml
Eau distillée	400	ml

Mesurer ces volumes avec une fiole jaugée de 100 ml.

Remarque : L'eau distillée doit être obtenue dans un récipient en verre Pyrex, et exempte de cuivre. Si on dispose d'une eau distillée dans un appareil métallique, il convient de la bi-distiller dans un appareil Pyrex.

II - UTILISATIONS DE LA SOLUTION DILUANTE

Le liquide de dilution sert à diluer les sérums à analyser, à diluer le complément, à diluer les antigènes, à diluer le sérum hémolytique. Il sert à laver les hématies et à préparer la suspension globulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN (F. H.) ROSENFIELD (R. E.) ADEBAHR (M. E.) - Vox Sanquinis, 1963, 8, 698.

2. ALLINE (M.) BERANGER (J.) - Bull. Soc. Fr. Derm. et Syphil. 1957, 64, 403.

3. AYEVA (R.) - Thèse Pharm. Paris 1963.

4. BIGGER (J. W.) - Jal. Path. et Bact. 1818, 22, 323.

5. BOREL (J.) DUREL (P.) - Path. Biol. 1959, 7, 2517.

6. BORY (J.) - Thèse (Etat) Pharm. Paris 1960.

7. BOY (W. C.) - Fundamentals of Immunology Interscience Publ. New York 1956.

8. BROOKS (S. C.) - J. Gén. Physiol. 1918-19, 1, 61.

9. COLOMBANT (J.) RIPAULT (J.) - Path. Biol. 1964, 12, 56.

10. DEMANCHE - Traité de la Syphilis - Doin. Paris 1931.

11. FRIBOURG-BLANC - Bull. Soc. Fr. derm. et Syph. 1956, 63, 343.

12. GASTINEL (P.) VAISMAN (A.) HAMELIN (A.) - A.B.C. 1961, 19, 215.

13. GERMAN (A.) et BORY (J.) - A.B.C. 1961, 19, 715.

14. HILL (B.) OSLER (A.) - J. Immunol. 1955, 75, 146.

15. HEIDELBERGER (M.) TREFFERS (H.) MAYER (M.) - J. Exp. Med. 1940, 71, 271.

16. HUMPHREY (J.H.) WHITE (R.G.) - Immunology for Students of Medecine - Blackwell Scientific Pub. Oxford 1964.

17. KABAT (E.A.) MAYER (M.M.) - Expérimental Immunochemistry, Thosam Springfield (I 11.) 1961.

18. KENT (J. F.) - Science, 1945, 105, 316.

19. KENT (J. F.) - BURANTZ (S. C.) REIN (C. R.) - J. Immunol. 1946, 53, 37.

20. KOLMER (J. A.) - Awer. J. Clin. Path. 1942, 12, 102.

21. KOLMER (J. A.) - Approved Laboratory Technic, Appleton Century Crafts, 1951.

22. LUNDQUIST (A.) NORDEN (A.) - Acta. Path. Microb. Scand. 1960, 48, 269.

23. MAC NEIL (C.) HELMICK (W. M.) FERRARI (A.) - Vox Sang. 1963, 8, 235.

24. MIKOL (C.) - Sem. Hôp. Paris, 1959, 7, 877.

25. MIKOL (C.) - Rev. Prat. 1958, 8, 1339.

26. MIKOL (C.) - Rev. Prat. 1961, 11, 1433.

27. MORRIS (M. C.) - J. Immunol. 1949, 62, 201.

28. MORSE (S.) - Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1921 - 22, 19, 17.

29. NORDEN (A.) - Acta Med. Scand. 1962, 171, 135.

30. OSLER (A. G.) HILL (B. M.) - J. Immunol. 1955, 75, 137.

31. PANGBORN (M.C.) - J. Biol. Chem. 1942, 143, 247.

32. PAUTRIZEL (R.) BOMARDU (F.) SZERNOVICZ (F.) - An. Inst. Past. 1957, 92, 707.

33. PAUTRIZEL (R.) SZERNOVICZ (F.) TOULZA (M.) - A.B.C. 1961, 19, 707.

34. PETERSON (E. A.) SOBER (H.A.) - Anal. Chem. 1959, 31, 857.

35. PILLOT (J.) BOREL (L. J.) - C.R. Acad. Sc. 1961, 252, 954.

36. PILLOT (J.) DUPOUEY (P.) FAURE (M.) - Ann. Inst. Post. 1961, 98, 734.

37. PILLOT (J.) NADAL (C.) BORDIER (J.) - Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph. 1958, 3, 304.

38. RONCHESE (A. D.) - La réaction de Bordet-Wassermann, Masson, Paris, 1919.

39. ROULIER (P.) - Thèse Pharm. Montpellier 1950.

40. RYLAND (A. L.) PICHARDT (W. D.) LEWIS (C. D.) - Technicon Symposium New York. 1964.

41. SANDOR (G.) VARGUES (R.) - Path. Biol. 1964, 12, 161.

42. SKEGGS (J. T.) Jr - Ann. J. Clin. Path. 1957, 28, 311.

43. STURGEON (P.) CEDERGREN (B.) Mc QUISTON (D.) - Vox Sang. 1963, 8, 438.

44. TECHNICON BIBLIOGRAPHY - 1964 Edition, Technicon Co, Chauncey (N. Y.)

45. VAISMAN (A.) HAMELIN (A.) - Presse Méd. 1958, 60, 1357.

46. VAISMAN (A.) HAMELIN (A.) - Presse Méd. 1961, 69, 1157.

47. VARGUES (R.) - Ann. Inst. Pasteur, 1965, 108, 196.

48. VARGUES (R.) - C. R. Soc. Biol. 1964, 158, 335.

49. VARGUES (R.) AYEVA (R.) - C. R. Soc. Biol. 1963, 157, 872.

50. VARGUES (R.) MORAUD (B.) GONTHIER (F.) - C. R. Soc. Biol. 1964, 158, 1736.

51. VARGUES (R.) STUDIEVIC (C.) GONTHIER (F.) MORAUD (B) Ann. Inst. Pasteur - A paraître.

53. VOGELSAND (T. M.) PILLOT (J.) FAURE (M.) - Ann Inst. Pasteur 1961, 100, 190.

54. VON KROGH - J. Inf. Dis. 1916, 19, 452.

55. WADSWORTH (A.) MALTANER (E.) MALTANER (F.) - J. Immunol. 1931, 21, 313.

FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Vu le Doyen : G. VALETTE

Vu et permis d'imprimer le 14 juin 1965

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

muray-print, paris (gal. 18-77)